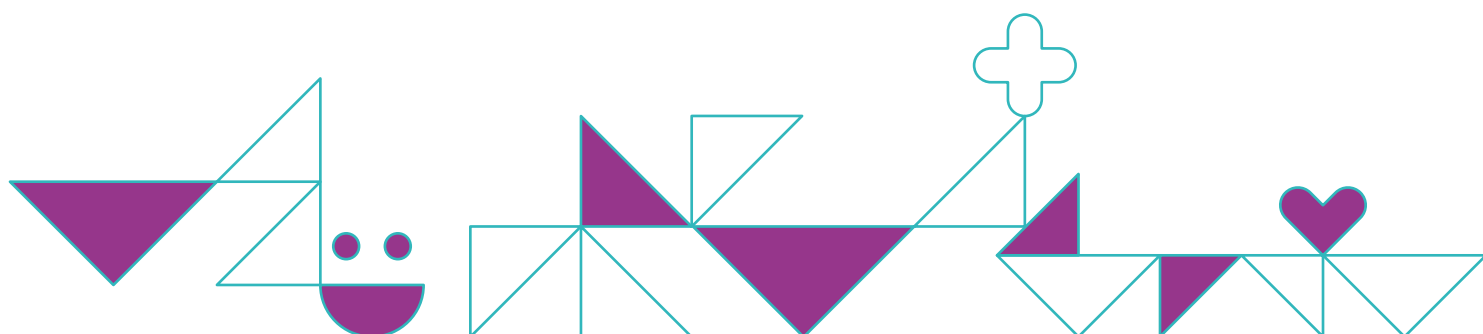




Mapa Genoma Brasil



Introdução à Genética e Genômica:
ênfase em oncogenética e cardiogenética

Módulo 2

Projeto Mapa Genoma Brasil

BP - A Beneficência Portuguesa de São Paulo

Gerente Executivo PROADI SUS:

Juliana Opípari

Coordenadora Projeto Mapa Genoma Brasil

Mariana Beraldo da Costa Saad

Coordenador Projeto Qualificação e Treinamento

José Pereira de Souza

Assessoria Técnica

Erika Maria Monteiro Santos

Autores

Natalia Campacci

Silvana Soares dos Santos

Equipe Qualificação e Treinamento

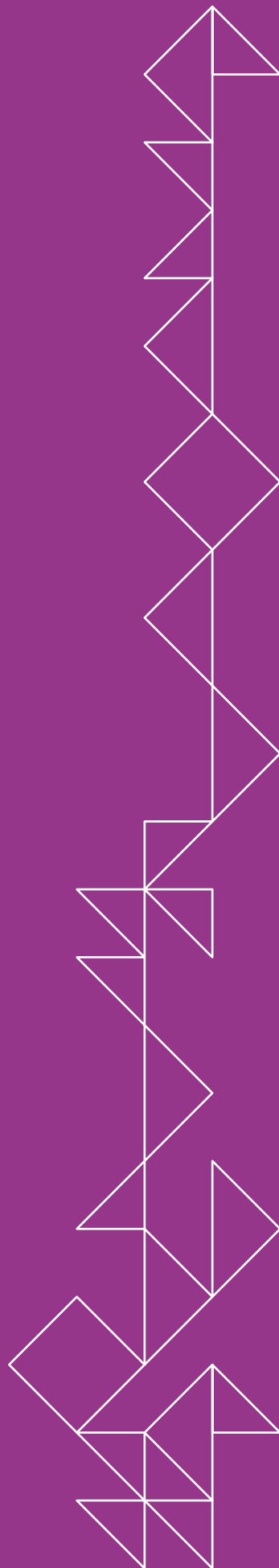
Amanda Aparecida Franca De Nobrega

Fernando Alves Alencar de Moura

Lucas Campacci



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.



Apresentação

Olá, prezado(a) colega.

Neste módulo, temos a intenção de avançar um pouco mais sobre o universo da genética e da genômica, mas com uma aplicação mais aprofundada na área da saúde.

Falaremos sobre técnicas moleculares que permitem avaliar o material genético de diversas formas e como os dados gerados por essas análises podem auxiliar na prática clínica.

Para que os conceitos sejam bem fundamentados, vamos passar por temas importantes que, ainda, trazem conceitos já aprendidos no módulo anterior e agrupam as novas informações que também darão suporte para os próximos módulos deste curso.

Ao final deste módulo, temos a expectativa de que você consiga iniciar a articulação de conceitos básicos da genética e da genômica com a prática clínica.

Bons estudos!

Equipe Mapa Genoma Brasil

Índice

1. Estrutura de Genes, Cromossomos e Tecnologias para Análise 05

2. Genômica e Técnicas de Sequenciamento 27

3. Variantes Genéticas na prática 34

4. Análise das “ômicas” 40

5. Aplicações clínica da Genômica – Testes genéticos e tratamentos 42

Referências 54

Dicas

- O índice é interativo, permitindo que você seja direcionado para o tópico desejado com um clique.
- Além disso, ao clicar no logo do Mapa Genoma Brasil no topo da página, você retornará ao índice.

1. Estrutura de Genes, Cromossomos e Tecnologias para Análise

Como visto no módulo anterior, o entendimento da hereditariedade teve seu ponto de partida com as descobertas de Gregor Mendel no século XIX. Mendel elucidou as regras básicas da transmissão de características entre gerações, ainda que, na época, não se soubesse qual era o material genético responsável por esses fenômenos. Foi apenas em 1953, com a descoberta da estrutura do DNA, que a biologia começou a desvendar os segredos do material hereditário.

Umas das importantes análises sobre o material genético deveu-se à citogenética, que permitiu a observação dos cromossomos, abrindo novas frentes para o entendimento de como anomalias cromossômicas podem influenciar a saúde humana. Em 1956, o número de cromossomos humanos foi estabelecido, revelando 23 pares que abrigam milhares de genes. Essas descobertas inauguraram a citogenética moderna e possibilitaram o estudo de doenças causadas por alterações cromossômicas, como o câncer. O próximo marco importante foi o Projeto Genoma Humano, que, iniciado em 1990 e concluído em 2003, mapeou o conteúdo genético humano. O projeto revelou a sequência de, aproximadamente, 3 bilhões de pares de bases, proporcionando um catálogo inicial de genes que impulsionou o

campo da genômica. É muito importante entender sobre a estrutura de genes e de cromossomos para desvendar os mecanismos das doenças.

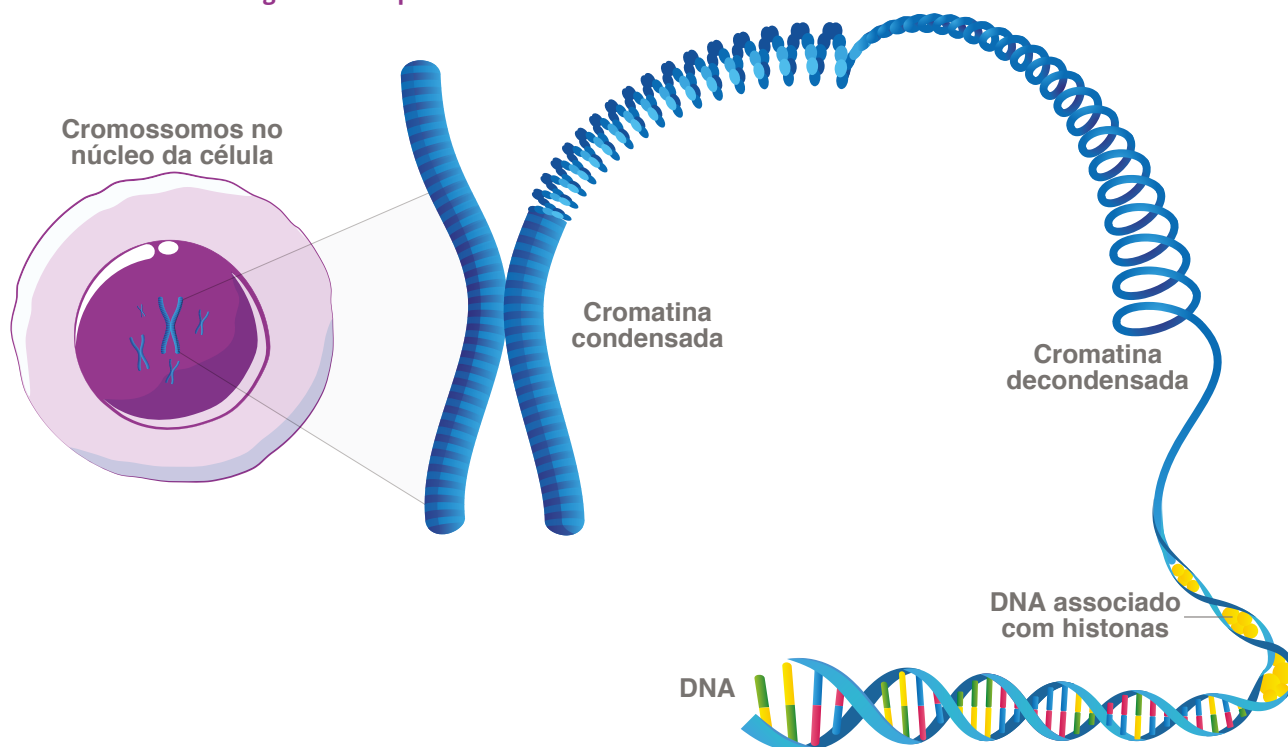
Esses conhecimentos mostram-se essenciais em diversas áreas da saúde, uma vez que mutações genéticas e alterações cromossômicas desempenham papéis centrais no desenvolvimento de muitas condições. Nesse sentido, vamos explicar as estruturas e as funções dos cromossomos e dos genes.

Cromossomos

Os cromossomos são formados por DNA e proteínas associadas; esse complexo é chamado de cromatina. As proteínas associadas ajudam a enrolar a molécula de DNA, reduzindo seu comprimento, como as histonas, que foram demonstradas no módulo 1 deste curso.

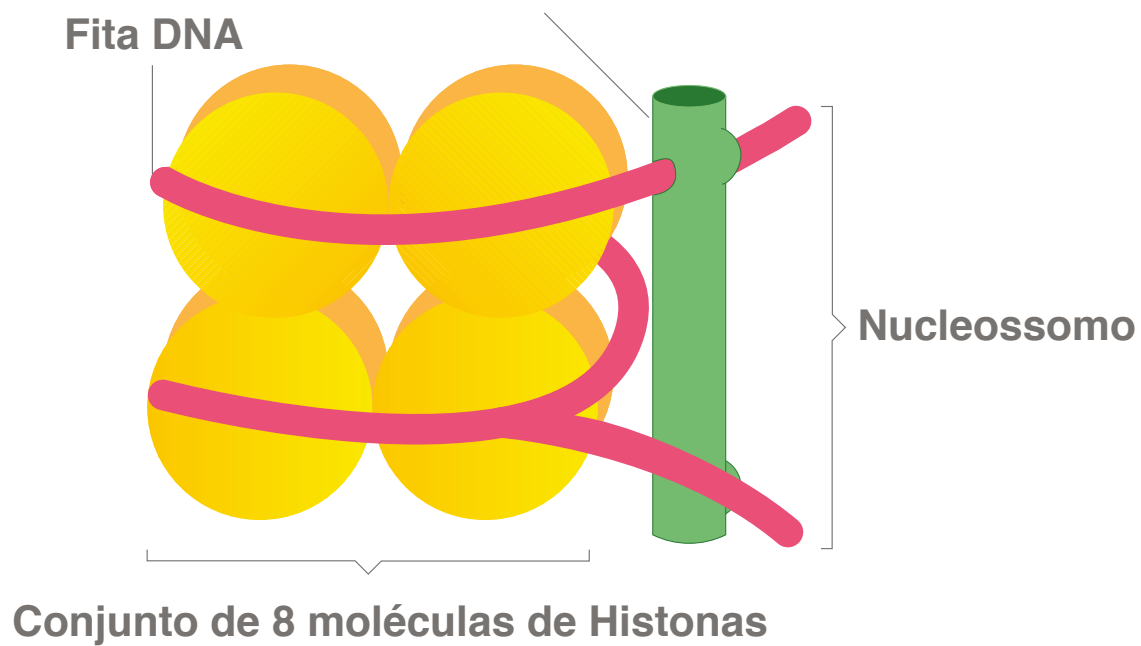
Repare na figura 1A, que ilustra o esquema de uma célula a qual possui cromossomos em seu núcleo e, avaliando a estrutura dos cromossomos, percebemos que está denominada de cromatina condensada a fita de DNA enovelada nas histonas (essa estrutura chamamos de nucleossomos), proteínas que, nessa conformação, não podemos ver, pois a estrutura condensada permite uma “diminuição” do tamanho físico da fita de DNA para que o material genético caiba no núcleo das células. A cromatina descondensada está mostrando a fita de DNA desnovelada, permitindo a visualização das histonas. Perceba que, quanto mais esticada a fita, mais conseguimos enxergar a formação da dupla fita do DNA e suas ligações de bases nitrogenadas complementares.

Figura 1A - Esquema ilustrativo da cromatina condensada e descondensada



Fonte: Shutterstock¹

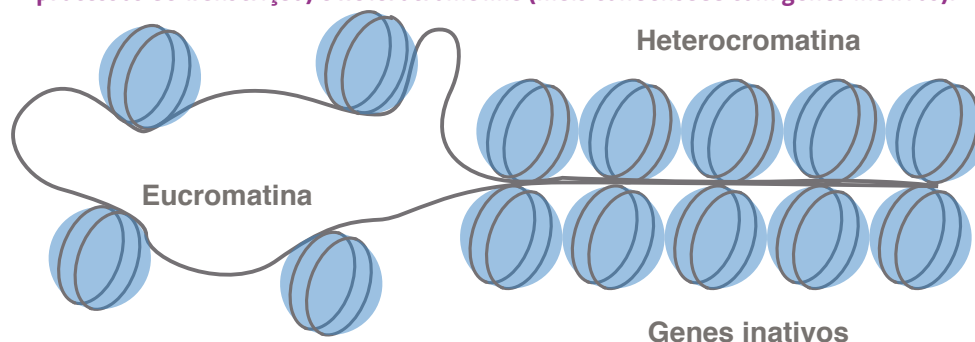
Figura 1B: Estrutura do Nucleossomo
Histona H1



Fonte: Elaboração própria.

Os nucleossomos (Figura 1B) podem apresentar-se em duas formas distintas: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é uma região menos compactada e está ativa para a transcrição gênica, permitindo que os genes sejam mais acessíveis para leitura e expressão. Em contraste, a heterocromatina é mais densamente compactada e, geralmente, inativa na expressão gênica, desempenhando um papel de proteção dos segmentos de DNA que não estão sendo utilizados no momento. Essa organização é fundamental para o funcionamento e a regulação da expressão genética. Veja, na figura 2, uma ilustração dessas duas formas.

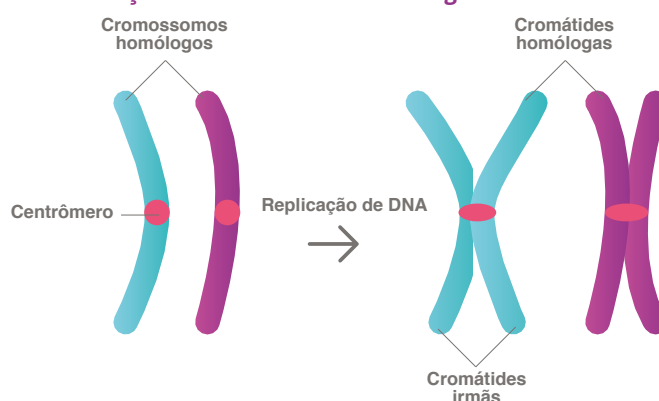
Figura 2 - Diferença das formas eucromatina (menos condensada, com genes ativos favorecendo processos de transcrição) e heterocromatina (mais condensada com genes inativos).



Fonte: Elaboração própria.

Após vermos do que os cromossomos são formados, veremos as suas estruturas. O cromossomo possui duas cromátides, cópias idênticas de um cromossomo que surgem após sua duplicação durante a fase de replicação celular. Cada cromossomo duplicado se apresenta com duas cromátides-irmãs, unidas pelo centrômero, formando um "X" característico. Durante a divisão celular, essas cromátides-irmãs são separadas para garantir que cada célula-filha receba uma cópia completa do material genético. Essa separação é essencial para manter a integridade genética nas novas células.

Figura 3 - Demonstração de cromossomos homólogos e cromátides homólogas



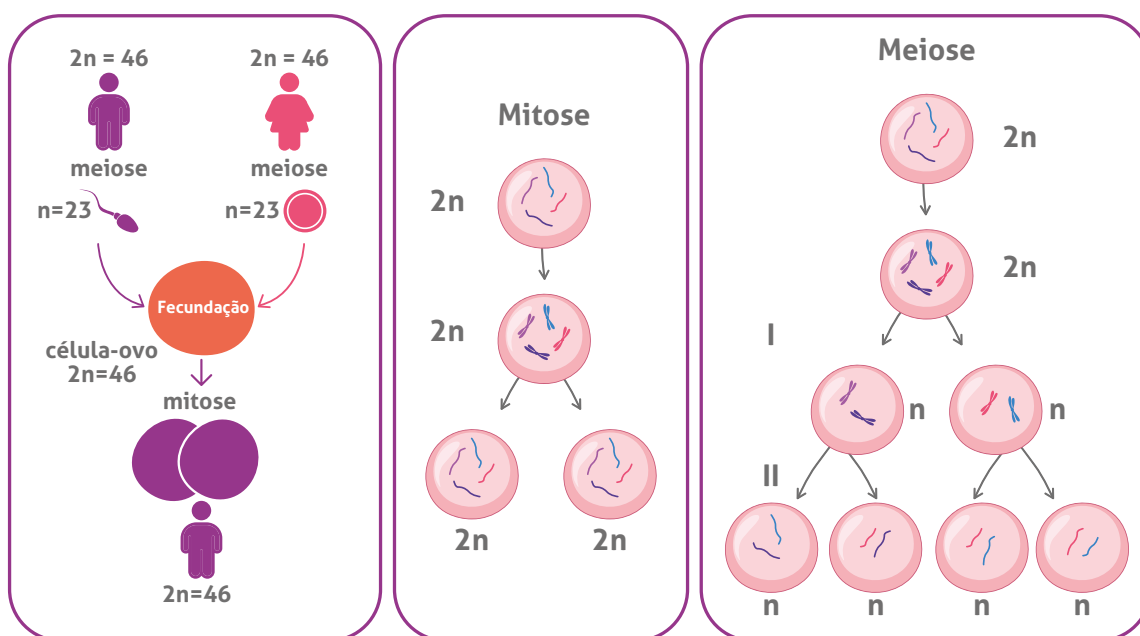
Fonte: Elaboração própria.

O centrômero é a região central do cromossomo onde essas cromátides se conectam, desempenhando papel crucial na divisão celular, pois, nele, se liga o cinetócoro — uma estrutura proteica que facilita a movimentação dos cromossomos em direção às células-filhas.

Saiba mais!

Os cromossomos homólogos são pares de cromossomos que possuem a mesma sequência de genes, mesma estrutura e tamanho, mas podem conter variações nos alelos (as versões dos genes) que carregam. Em organismos diploides ($2n$), como os seres humanos, cada célula somática possui dois conjuntos de cromossomos, um herdado do pai e outro da mãe, totalizando 23 pares de cromossomos homólogos.

Durante a meiose (processo na formação dos gametas, verificando-se o surgimento de células com metade do número de cromossomos), há o cruzamento e a troca de material genético entre os cromossomos, contribuindo para a variabilidade genética dos descendentes.

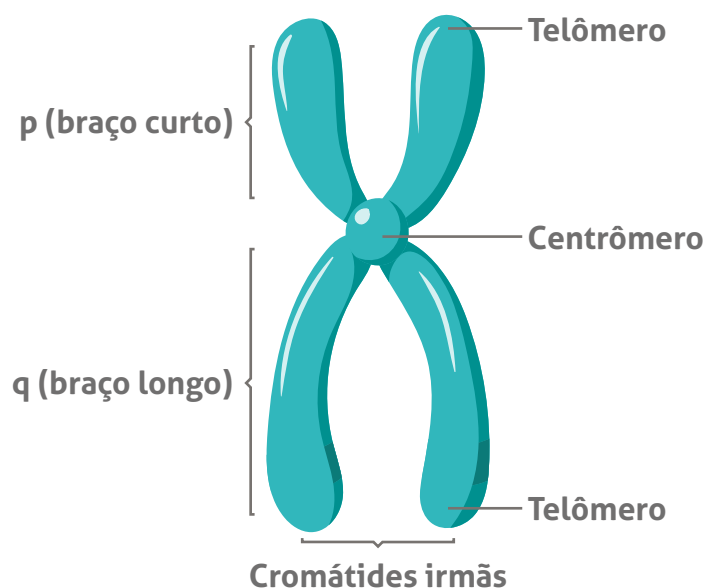


Fonte: Elaboração própria.

Além disso, o centrômero divide o cromossomo em duas partes desiguais, formando o braço p (braço curto) e o braço q (braço longo). Esses braços contêm segmentos específicos de DNA e a variação em tamanho e formato dos cromossomos contribui para a organização e a identificação do material genético (Figura 4).

Nas extremidades de cada cromossomo, encontram-se os telômeros, compostos de DNA repetitivo. Eles têm a função de proteger o material genético e de evitar que os cromossomos se fundam uns com os outros. Durante a divisão celular, as fibras do fuso mitótico ligam-se ao centrômero e encarregam-se de separar as cromátides irmãs e de levá-las às extremidades opostas da célula. Esse processo é fundamental para que cada célula-filha receba a quantidade adequada de material genético, mantendo a integridade da informação genética.

Figura 4 - Estruturas do cromossomo



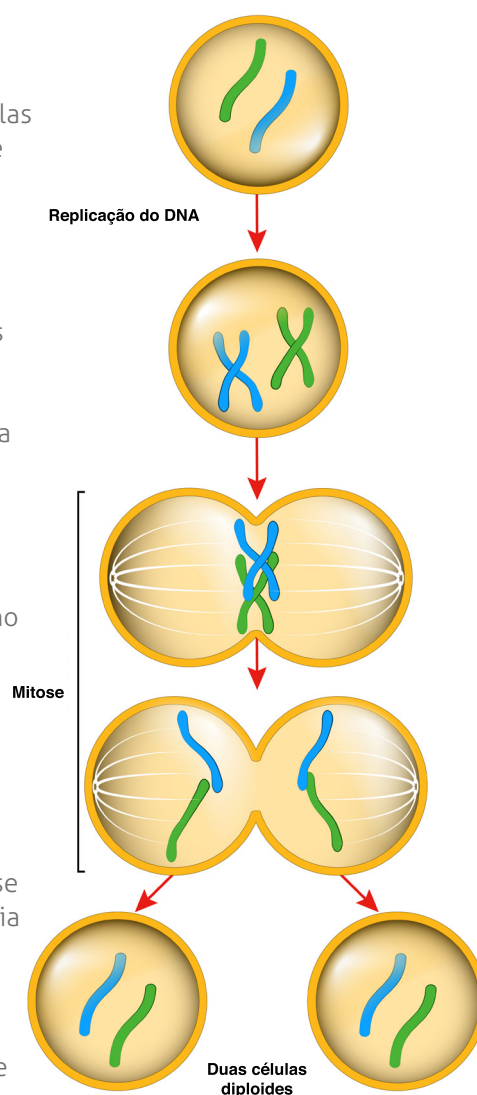
Fonte: Elaboração própria.

Saiba mais!

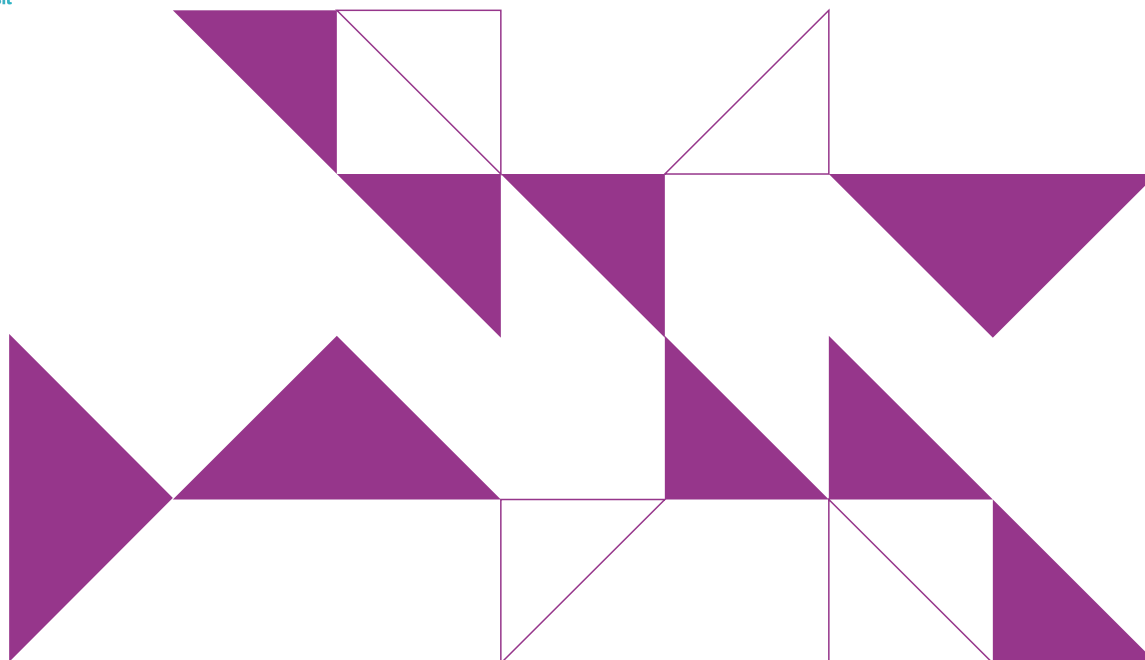
A mitose é um processo de divisão celular que ocorre em células eucarióticas, resultando em duas células-filhas geneticamente idênticas à célula-mãe. É fundamental para o crescimento, reparo e regeneração de tecidos.

O ciclo mitótico é dividido em várias fases:

- 1. Prófase:** Durante esta fase, a cromatina se condensa para formar cromossomos visíveis, cada um composto por duas cromátides irmãs unidas pelo centrômero. A membrana nuclear começa a se desintegrar, e os centrossomos (organelas que organizam os microtúbulos) se movem para os polos opostos da célula.
- 2. Prometáfase:** A membrana nuclear se desintegra completamente, permitindo que os microtúbulos do fuso mitótico se conectem aos centrômeros dos cromossomos. Os cromossomos começam a se mover em direção ao plano equatorial da célula.
- 3. Metáfase:** Os cromossomos alinham-se no equador da célula, formando a chamada "placa metafásica". Este alinhamento é crucial para garantir que cada célula-filha receba um conjunto completo de cromossomos.
- 4. Anáfase:** As cromátides irmãs são puxadas para os polos opostos da célula à medida que os microtúbulos do fuso se encurtam. Isso garante que cada nova célula terá uma cópia idêntica do material genético.
- 5. Telófase:** Os cromossomos começam a descondensar, retornando ao estado de cromatina. As membranas nucleares se reconstituem em torno dos dois conjuntos de cromossomos, formando dois núcleos distintos.

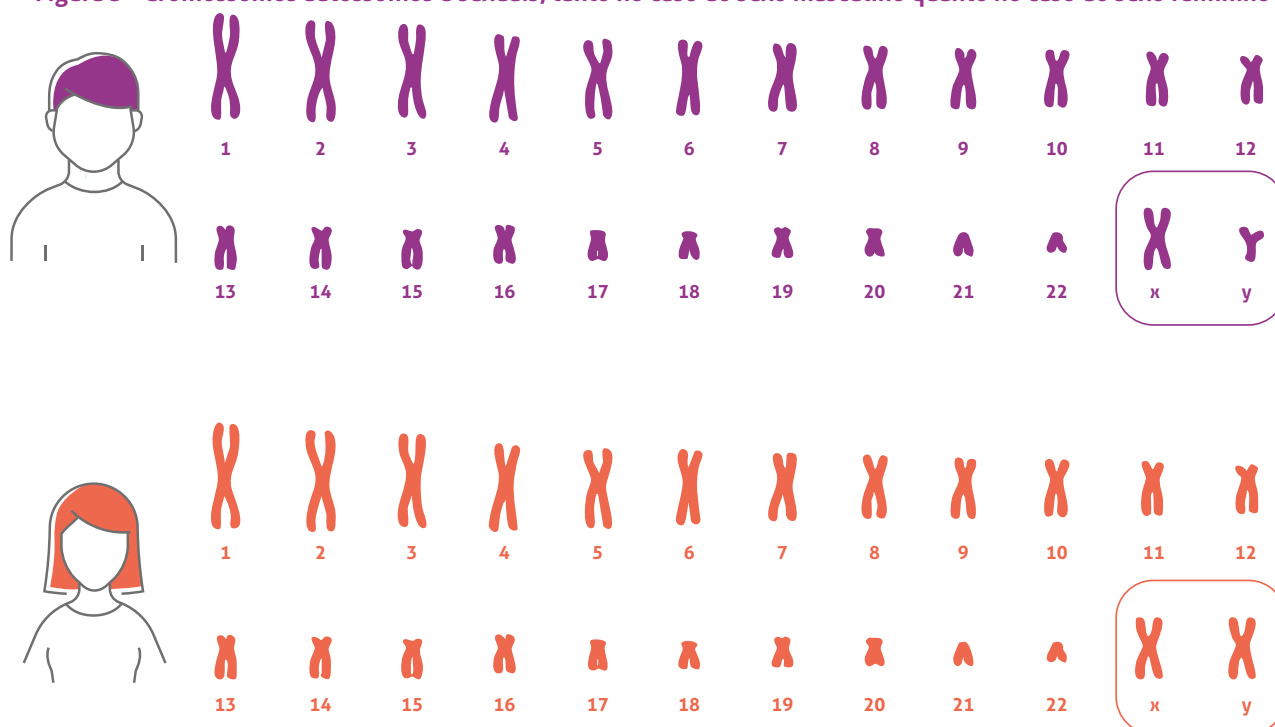


Fonte: Shutterstock²



O ser humano possui, no núcleo de suas células, 23 pares de cromossomos dos quais possuem as sequências específicas de DNA para dar sinais da organização e das características de um organismo. Os cromossomos são divididos em autossomos e sexuais e o ser humano possui 22 pares de cromossomos autossomos e 1 par de cromossomos sexuais, que são aqueles que determinam o sexo do indivíduo. Os cromossomos autossomos são iguais em ambos os sexos e denominados por números; já os do sexo masculino têm, na conformação, os cromossomos sexuais compostos pelos chamados cromossomos X e Y, enquanto as mulheres possuem X e X. Veja, na figura 5, essa diferenciação entre os sexos.

Figura 5 - Cromossomos autossomos e sexuais, tanto no caso do sexo masculino quanto no caso do sexo feminino

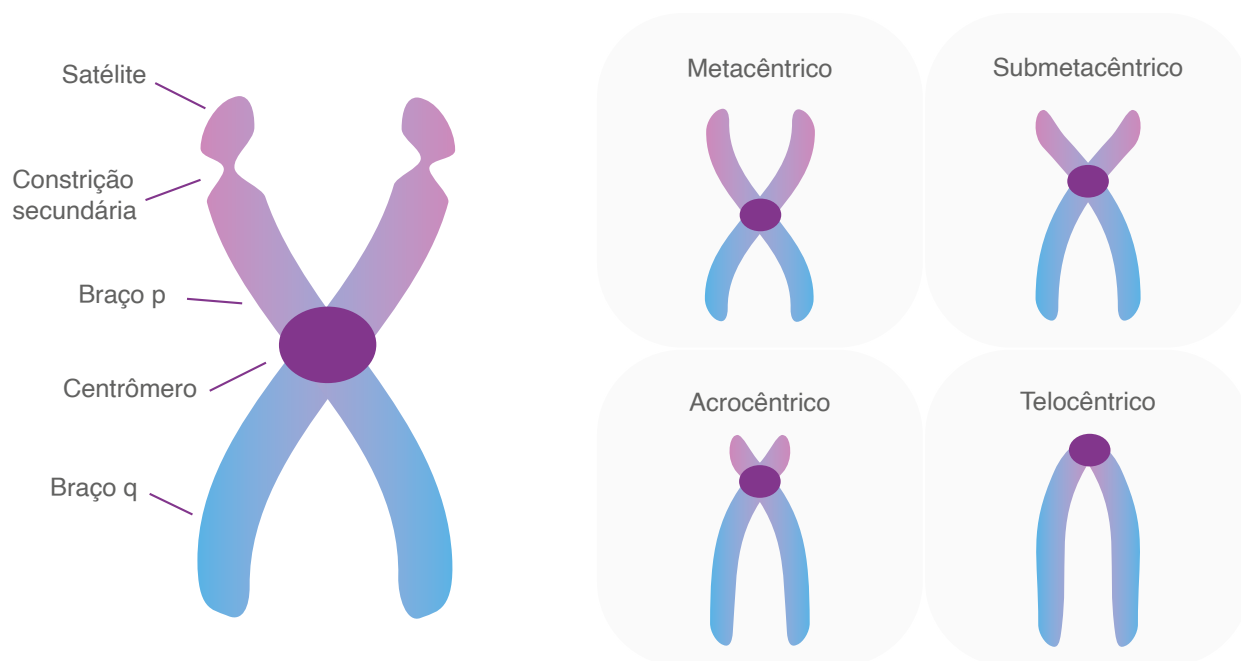


Fonte: Elaboração própria.

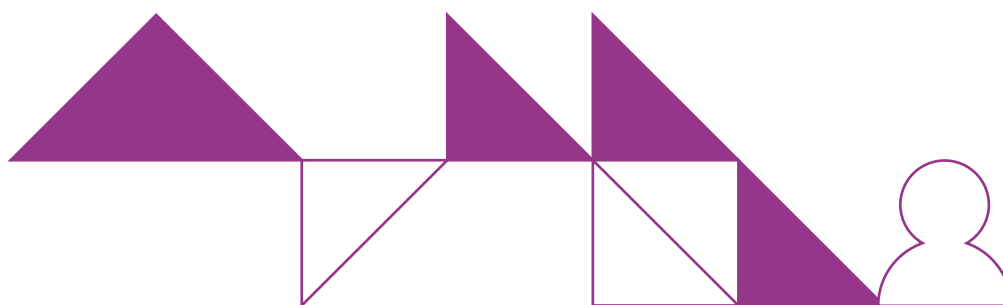
Os cromossomos podem-se classificar de várias maneiras com base em diferentes características. Os cromossomos metacêntricos são aqueles que possuem o centrômero localizado no meio, resultando em dois braços de comprimento igual (um exemplo é o cromossomo 1 humano). Os cromossomos submetacêntricos são aqueles em que o centrômero está, ligeiramente, deslocado do centro, resultando em um braço maior e um braço menor (exemplo o cromossomo 4 humano). Já os cromossomos acrocêntricos são aqueles que possuem o centrômero próximo a uma extremidade, resultando em um braço muito curto e um braço longo (exemplo os cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 humanos). Por fim, os cromossomos telocêntricos são aqueles dos quais o centrômero está localizado em uma extremidade, formando um único braço. Este tipo de cromossomo não é encontrado nos humanos, mas é comum em alguns outros organismos.

Veja os exemplos na figura 6.

Figura 6 - Tipos de cromossomos de acordo com a localização do centrômero



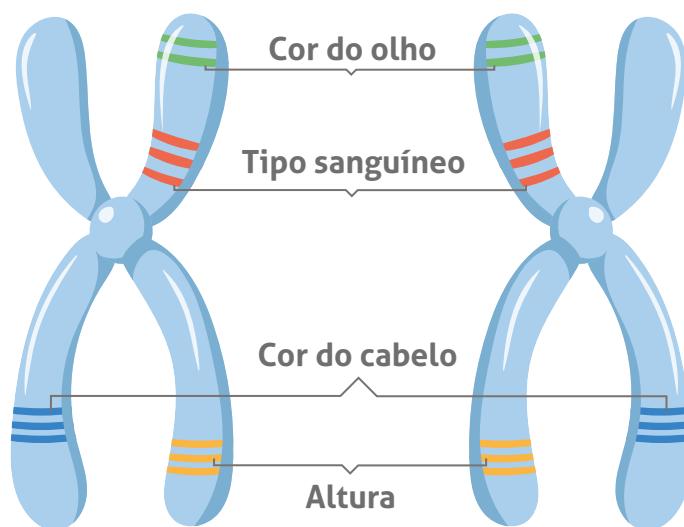
Fonte: Elaboração própria.



Os cromossomos são, portanto, estruturas específicas que contêm o material genético de um organismo. Cada cromossomo carrega milhares de genes que codificam as instruções para a produção de proteínas e que regulam diversas funções biológicas. Por exemplo, os humanos possuem 23 pares de cromossomos, totalizando 46 cromossomos, que contêm cerca de 20.000 a 25.000 genes, os quais determinam características herdadas, como a cor dos olhos, a altura e a predisposição a certas doenças.

Veja um esquema ilustrativo na figura 7.

Figura 7 - Esquema ilustrativo dos genes organizados nos cromossomos



Fonte: Elaboração própria.

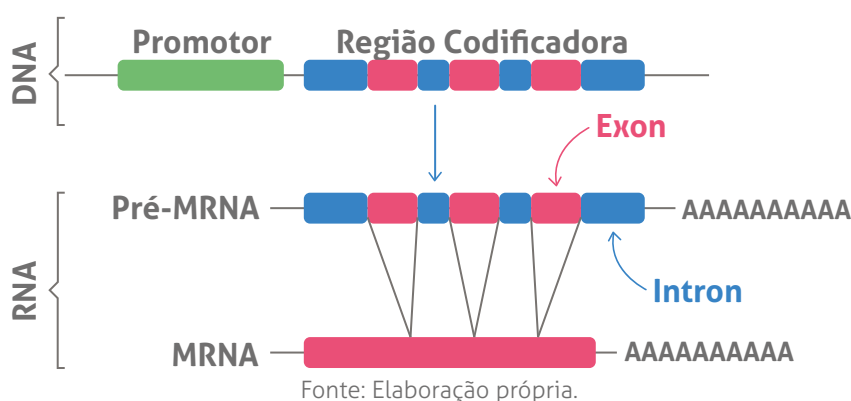
A seguir, vamos compreender melhor o que são os genes e suas estruturas.

Genes

Os genes são segmentos de DNA que contêm as instruções necessárias para a produção de proteínas e a regulação de processos biológicos em um organismo. Cada gene é uma unidade funcional da hereditariedade e é responsável por características específicas, como a cor dos olhos, o tipo de cabelo, o tipo sanguíneo e a predisposição a certas doenças, por exemplo.

Como estrutura, os genes são formados por sequências de nucleotídeos, que são as unidades básicas do DNA (bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina). A sequência dessas bases determina a informação genética contida no gene. De forma mais específica, existem regiões chamadas de exons (as partes que codificam proteínas) e íntrons (as partes não codificantes que são removidas durante o processamento do RNA). Veja, na figura 8, uma esquematização da estrutura de um gene, demonstrando os exons e os íntrons.

Figura 8 - Esquema da estrutura do gene no DNA para a formação de RNA mensageiro



Perceba que, na figura 8, temos outras especificações, como uma região promotora. Essa região é uma sequência do DNA localizada próxima ao início de um gene, tipicamente entre 100 a 1.000 pares de bases acima do local de início da transcrição. Essa sequência é reconhecida por proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, determinando onde a maquinaria celular se liga para iniciar todo o processo de transcrição.

Alterações genes (mutações) podem ser classificadas de várias maneiras, dependendo de sua natureza e de seu impacto. Como vimos no módulo 1, as alterações na sequência dos genes não, necessariamente, refletem alguma patologia, mas conhecê-las é muito importante para relacionar sua presença no código genético com a expressão de fenótipos de doenças. Veja, a seguir, os tipos de mutações.

Mutações Pontuais - Essas mutações envolvem a alteração de uma única base no DNA.

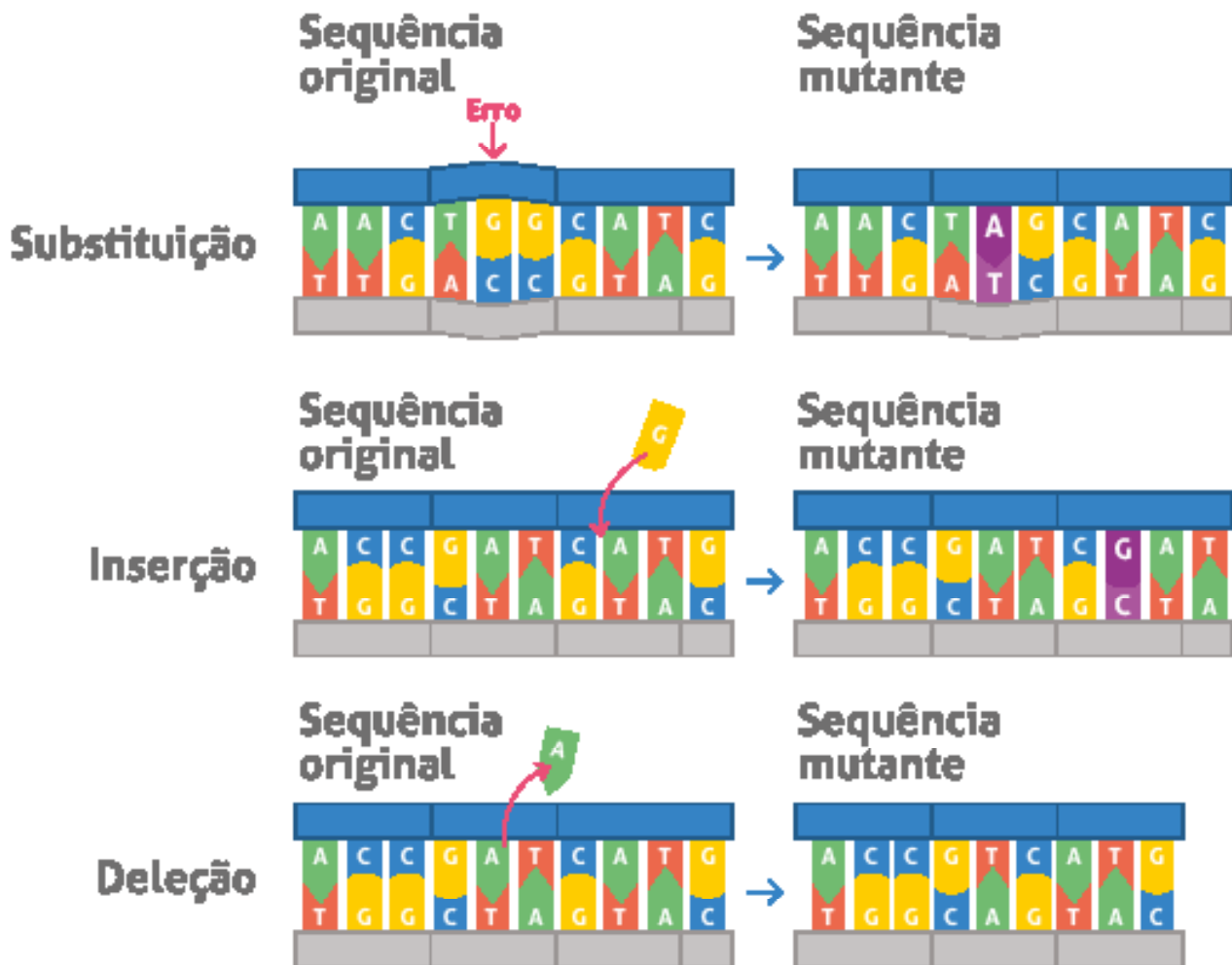
- **Substituição de Base:** Uma base é substituída por outra.
 - Mutação Silenciosa: Não altera o aminoácido produzido.
 - Mutação Missense: Altera um aminoácido no polipeptídeo.
 - Mutação Nonsense: Cria um códon de parada, resultando em uma proteína truncada.

Inserções e Deleções - Essas mutações envolvem a adição (inserção) ou a remoção (deleção) de uma ou mais bases.

- **Inserções:** Adição de uma ou mais bases ao DNA.
- **Deleções:** Remoção de uma ou mais bases do DNA.
- Ambas podem causar uma **mudança de quadro de leitura** (frameshift), alterando a sequência de aminoácidos a partir do ponto da mutação.

A figura 9 possui um resumo dos tipos de mutação na sequência do DNA.

Figura 9 - Exemplos de mutação na sequência do DNA



Fonte: Elaboração própria.

Veremos, mais ao final do módulo, como essas mutações podem interferir nas questões de saúde de um indivíduo.

Conhecer as estruturas dos genes e dos cromossomos favoreceu avanços para realizar a avaliação funcional molecular que garante melhores formas para realizar a medicina personalizada, uma vez que auxilia no entendimento de mutações específicas que contribuem para doenças genéticas.

Nesse sentido, vamos compreender como se realiza a análise dos cromossomos na prática clínica.

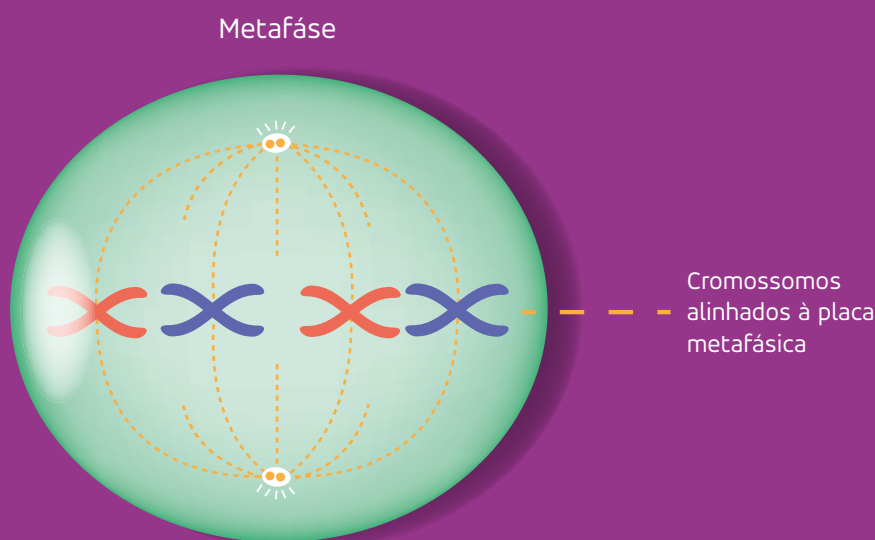
As análises cromossômicas possuem a intenção de avaliar a constituição cromossômica de uma pessoa, a fim de identificar a presença de alguma alteração. Chamamos essa análise de **cariótipo**, uma vez que é uma técnica que permite a identificação de possíveis alterações do número de cromossomos e em sua estrutura.

Esse exame é mais utilizado, portanto, para detectar as alterações cromossômicas, sendo indicado quando há um quadro clínico sugestivo de uma cromossomopatia como:

1 - Restrição de crescimento intrauterino e pós-natal; 2 - Características fenotípicas de síndromes cromossômicas; 3 - Casal com histórico de aborto precoce de repetição ou de infertilidade; 4 - Casos de natimorto ou morte neonatal; 5 - Genitália atípica; 6 - Diagnóstico pré-natal em casos de idade materna avançada; 7 - Avaliação de tumores; 8 - Esclarecimento de resultados não muito bem definidos por outras técnicas de análise cromossômica.

Para que a análise cromossômica obtenha melhor identificação, é importante que os cromossomos estejam bem compactados; por isso, as células analisadas estão na fase de metáfase do ciclo celular.

Vamos recordar?



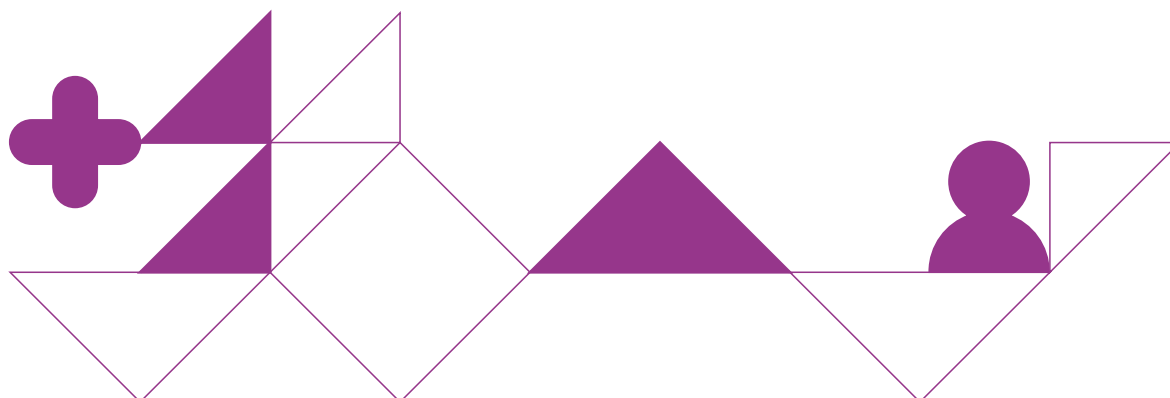
A metáfase é uma das fases da mitose da qual os cromossomos migram para a região equatorial da célula com seu maior nível de compactação. Cada cromossomo possui duas cromátides irmãs que se prendem aos microtúbulos por meio de uma região denominada cinetócoro. O alinhamento correto dos cromossomos e das cromátides irmãs é extremamente necessário para a correta distribuição do material genético para as células filhas. Esse plano equatorial é chamado de **placa metafásica** e esta é a origem do nome dessa fase do ciclo celular.

O método mais utilizado para realizar o cariótipo é a cultura de linfócitos do sangue periférico, mas pode ser com outras células e tecidos, como fibroblastos da pele e células da medula óssea, em materiais como células fetais do líquido amniótico ou do sangue do cordão umbilical ou, ainda, de diferentes tecidos de material de aborto ou de células tumorais. As etapas para realizar o exame estão descritas da figura 10.

Figura 10 - Etapas para realização do Cariótipo em banda G para diferenciar cromossomos do mesmo tamanho e com a mesma posição de centrômero. De acordo com o nível de condensação do DNA



Fonte: Elaboração própria.



A análise do cariótipo realiza-se em microscópio, podendo ter auxílio de programas computacionais para a organização dos cromossomos e a documentação. Com o cariótipo, podemos identificar as alterações cromossômicas tanto numéricas quanto estruturais.

Veja um exemplo de cariótipo sem nenhuma alteração identificada na figura 11, dividida em figura 11 A — representa um cariótipo do sexo biológico masculino — e em figura 11 B — representa um cariótipo do sexo biológico feminino.

Figura 11A – Cariótipo normal masculino: 46,XY

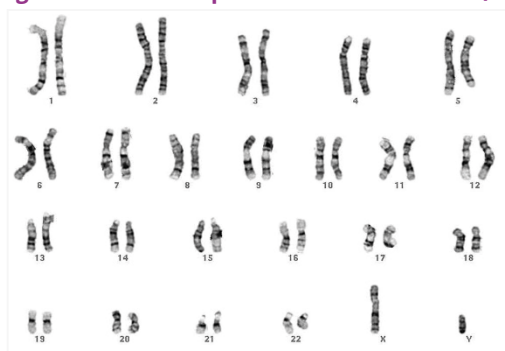


Figura 11B- Cariótipo normal feminino: 46,XX

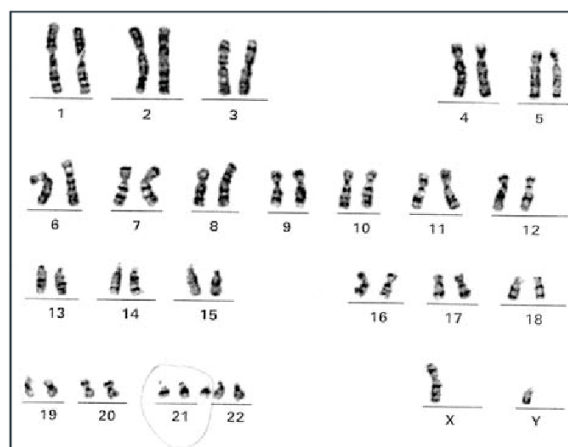


Fonte: Elaboração própria.

O registro de um cariótipo é dado primeiro pelo número total de cromossomos, seguido por vírgula e pela especificação dos cromossomos sexuais. Assim, os cariótipos femininos e masculinos normais são descritos, respectivamente, como 46, XX e 46, XY (como relatado nas figuras 11A e 11B).

A presença de alterações numéricas relaciona-se ao número de cromossomos que podem estar em excesso ou em falta. No cariótipo, os cromossomos extras são descritos após o sinal de "+", enquanto os em falta, após o sinal de "-". Então, um resultado de cariótipo descrevendo 47, XY, +21 relata a trissomia do cromossomo 21 (há um cromossomo 21 a mais), em um indivíduo do sexo masculino (figura 12).

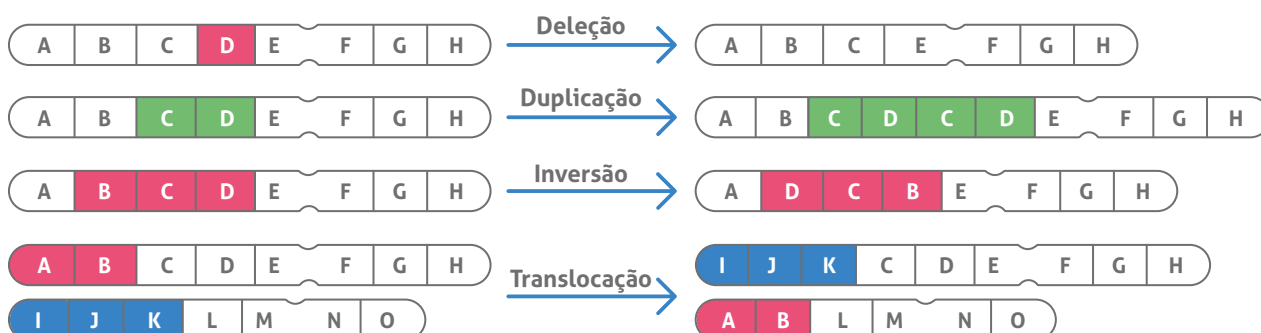
Figura 12 - Cariótipo com resultado de Trissomia do cromossomo 21 em um indivíduo do sexo masculino: 47, XY, +21



Fonte: Elaboração própria.

Já com relação às questões estruturais, podemos identificar a quebra, como as deleções e as translocações. Veja um exemplo esquemático das alterações estruturais cromossômicas na figura 13.

Figura 13 - Alterações estruturais cromossômicas



Fonte: Elaboração própria.

Alterações cromossômicas estruturais também possuem suas especificações padronizadas no cariótipo, devendo conter o total de números de cromossomos, os cromossomos sexuais, a abreviatura entre parênteses do tipo de alteração estrutural, número do(s) cromossomo(s) envolvido(s) na alteração (ou a letra para X e Y) e a banda em que ocorreu a quebra. A seguir, na tabela 1, temos a abreviatura dos principais tipos de alterações estruturais, com exemplos de resultados de cariótipos.

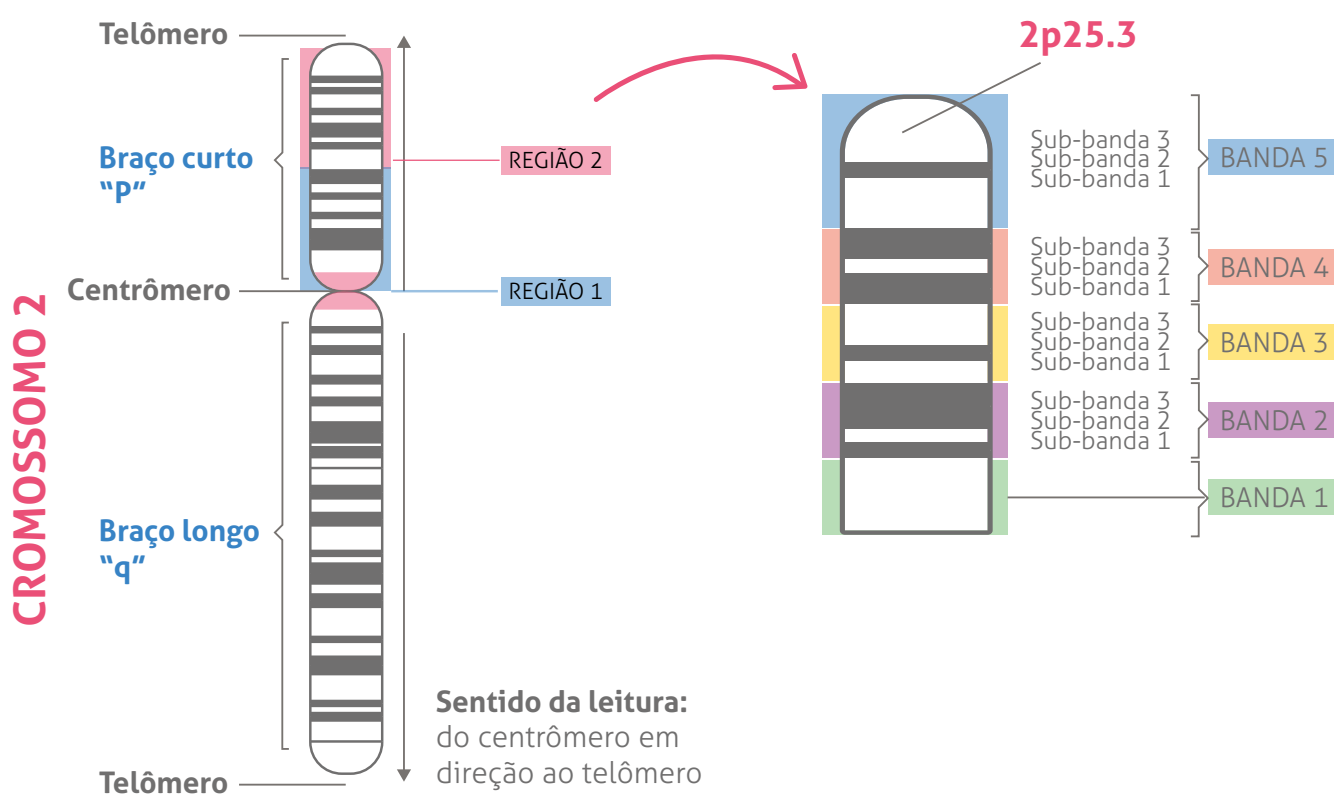
Tabela 1 - Exemplos de alterações cromossômicas estruturais com sua descrição e leitura

Tipo de alteração cromossômica estrutural	Abreviatura	Exemplo de descrição no cariótipo	Leitura
Deleção (Quando há uma perda de material cromossômico)	del	46,XY,del(5)(p13)	Indivíduo do sexo masculino, com uma deleção no braço curto do cromossomo 5, com ponto de quebra na banda 5p13, resultando na monossomia parcial da região terminal do braço curto do cromossomo 5 até a banda 5p13.
Duplicação (Presença de um segmento extra no cromossomo)	dup	46,XX,dup(1)(q22q25)	Indivíduo do sexo feminino com uma duplicação no braço longo do cromossomo 1 entre as bandas 1q22 e 1q25.
Inversão (Quando uma parte do cromossomo se fragmenta e, depois, se liga ao mesmo cromossomo, porém de forma invertida)	inv	46,XX,inv(9)(p12q13)	Indivíduo do sexo feminino com uma inversão no cromossomo 9 com ponto de quebra entre as bandas 9p12 e 9q13.
Translocação (Troca de partes entre os cromossomos)	t	46,XY,t(6;14)(p21;q32)	Translocação entre os cromossomos 6 e 14 com pontos de quebra nas bandas 6p21 e 14q32

Fonte: Elaboração própria.

O Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana (ISCN) possui, como norma, que os cromossomos sejam divididos em regiões, banda e sub-bandas, de forma a ser possível o registro das alterações em sua estrutura. As bandas são numeradas a partir do centrômero em direção às extremidades dos braços cromossômicos. Veja, na figura 14, a forma de leitura.

Figura 14 - Exemplo para a compreensão de leitura do 2p25.3 - Braço curto do cromossomo 2, região 5, banda 5 sub-banda 3.



Fonte: Elaboração própria.

Nesse sentido, se nos depararmos com a nomenclatura 1p31.2, sabemos que estamos nos direcionando para o braço curto do cromossomo 1, na região 3, banda 1 e sub-banda 2.

O cariótipo possui algumas limitações, uma vez que consegue avaliar alterações que estão abaixo do nível de resolução, não sendo possível a identificação de microdeleções e microduplicações, por exemplo. Por isso, existem outros exames que podem auxiliar na busca de alterações que justifiquem o quadro clínico a investigar. Em algumas situações, é necessária a associação de diferentes técnicas para uma melhor conclusão. Por isso, é muito importante o conhecimento das técnicas para que se faça possível conduzir o andamento da investigação diagnóstica de forma adequada.

Você sabia?



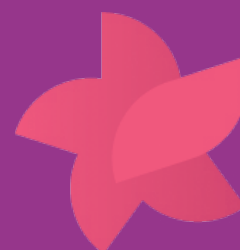
Mosaicismo: condição em que um organismo apresenta duas ou mais populações celulares geneticamente diferentes em seu corpo. Isso pode ocorrer devido a mutações que acontecem após a fertilização, resultando em células que têm diferentes composições genéticas.

Quando há a presença de mosaicismo cromossômico, ou seja, há duas ou mais linhagens celulares com cariótipos distintos, a representação é feita com cada linhagem separada por uma barra na diagonal e com o número de células analisadas de cada linhagem entre colchetes. Portanto, um cariótipo com a descrição 47, XY, +21[24] / 46, XY[16] indica uma trissomia do cromossomo 21 em mosaico, a partir de 40 células, sendo 16 delas com cariótipo normal.

Para esses casos de alterações, como microdeleções e microduplicações, pode-se realizar a técnica chamada de Hibridação in situ por Fluorescência (FISH). Essa técnica molecular baseia-se na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir do uso de sondas específicas, marcadas com fluorescência, que pareará com as bases complementares de uma sequência-alvo de DNA correspondente de um cromossomo específico.

Por isso, dá-se o nome de hibridização por fluorescência pelo fato de o pareamento ocorrer com a presença de um marcador fluorescente.

Comece a memorizar essa informação

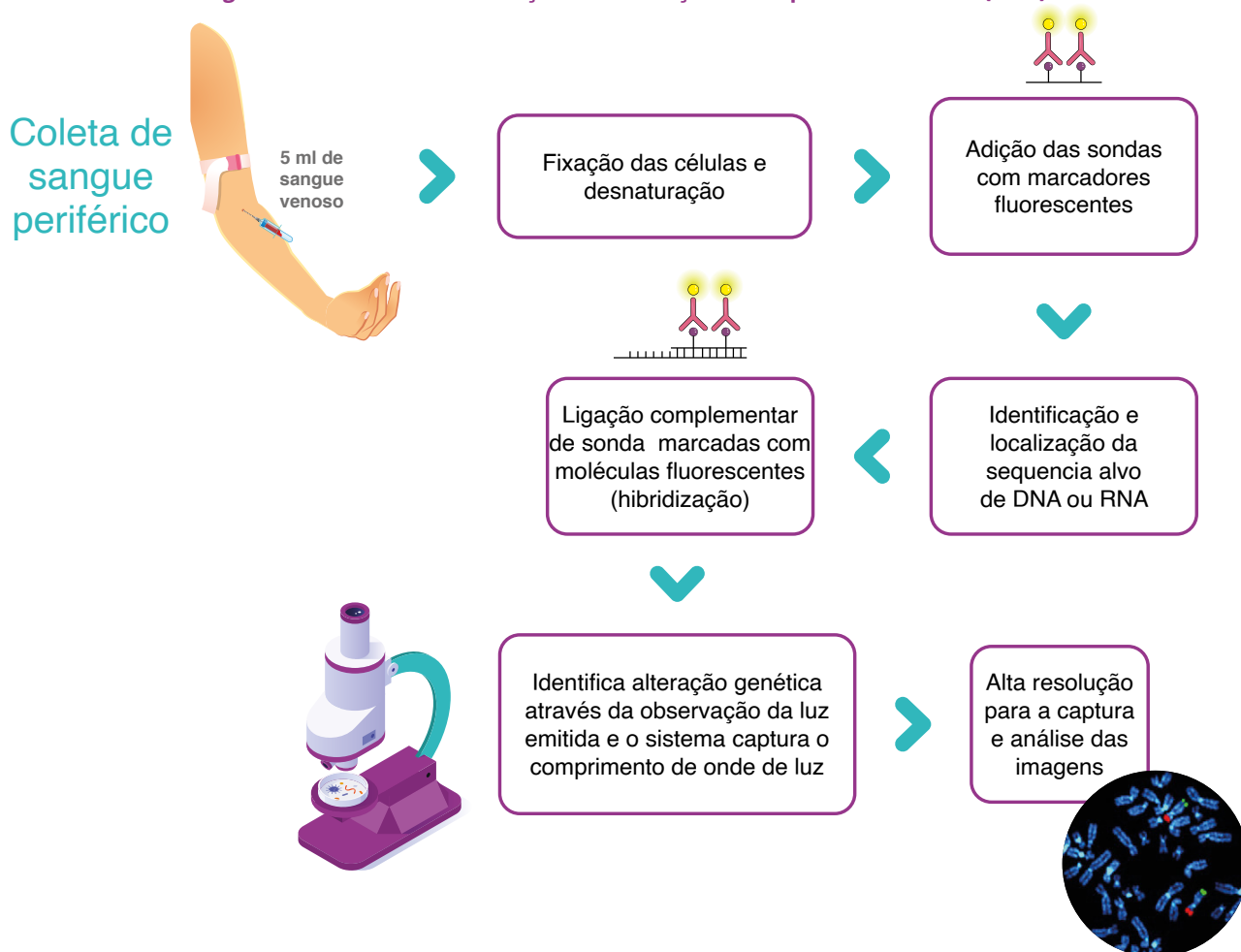


Sondas: são sequências de nucleotídeos complementares desenvolvidos a partir de segmentos conhecidos de DNA ou RNA que se deseja identificar.

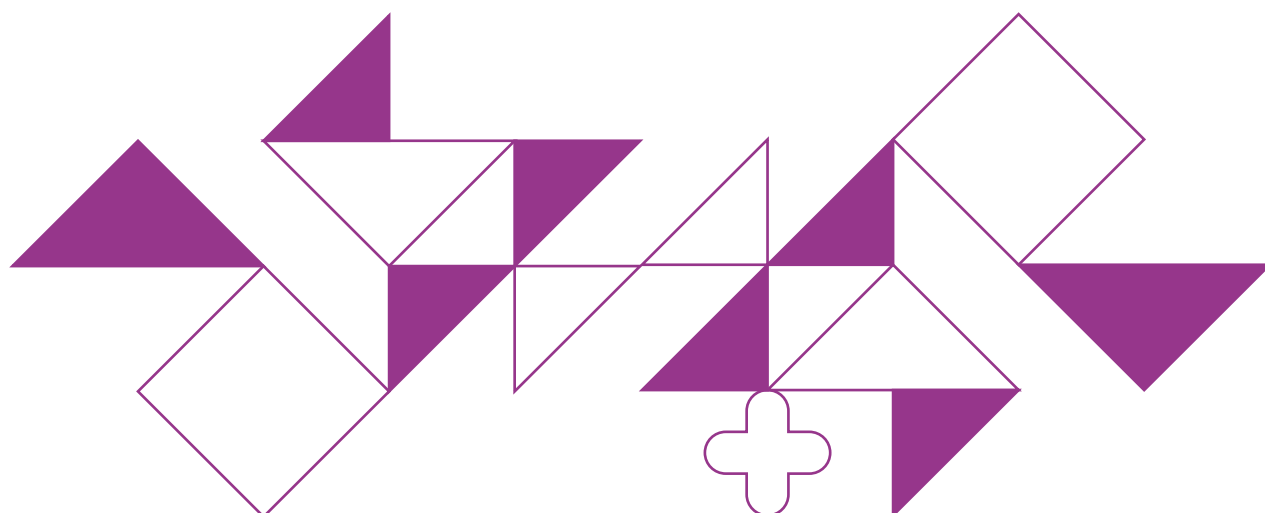


A figura 15 mostra o processo de toda a técnica FISH. É importante ressaltar que, para empregá-la, se faz necessário ter, previamente, a suspeita da região de interesse em investigação.

Figura 15 - Processo da realização da Hibridação in situ por Fluorescência (FISH)

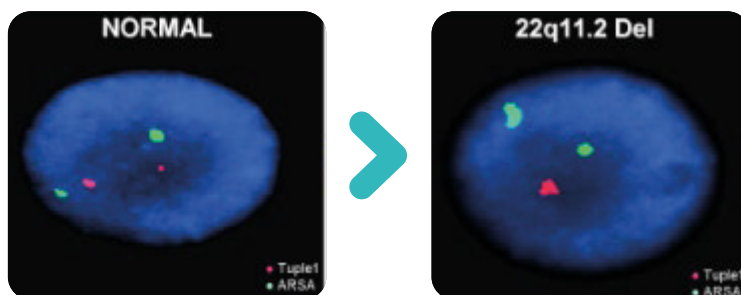


Fonte: Elaboração própria.



Para auxiliar a visualização de um resultado, a figura 16 mostra a diferença de um resultado do exame FISH normal e um outro com uma possível deleção no braço longo do cromossomo 22, o que configura o diagnóstico de Síndrome DiGeorge (imunodeficiência que provoca alterações na imunidade celular e má formações faciais e cardíacas; a causa desta síndrome é a deleção de um gene ou de um grupo de genes localizados na região 22q1).

Figura 16 - Análise pelo método FISH – Na imagem à esquerda, há 2 pares de marcadores e, na direita, apenas 1 par completo e um sozinho, indicando uma possível deleção.



Fonte: Elaboração própria.

Outra técnica desenvolvida para evidenciar a falta, ou o excesso de material genômico, é o MLP - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, ou Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação. Essas alterações, identificáveis nessa técnica, são conhecidas como grandes deleções, amplificações ou inserções no gene com mais de 1.000 pares de base.

Quando realizamos a técnica do MLPA, podemos analisar regiões específicas, sendo éxons de um único gene, ou éxons de alguns genes associados a uma síndrome; nesse sentido, é uma técnica solicitada na prática clínica para pacientes com suspeita de alguma doença já conhecida.

Para que possamos chegar a um resultado, as etapas do MLPA são divididas em seis principais partes, conhecidas como: 1 - Desnaturação do DNA da amostra; 2 -Hibridização; 3 - Ligação; 4 - Amplificação por PCR; 5 - Separação de Fragmentos; 6- Análise.

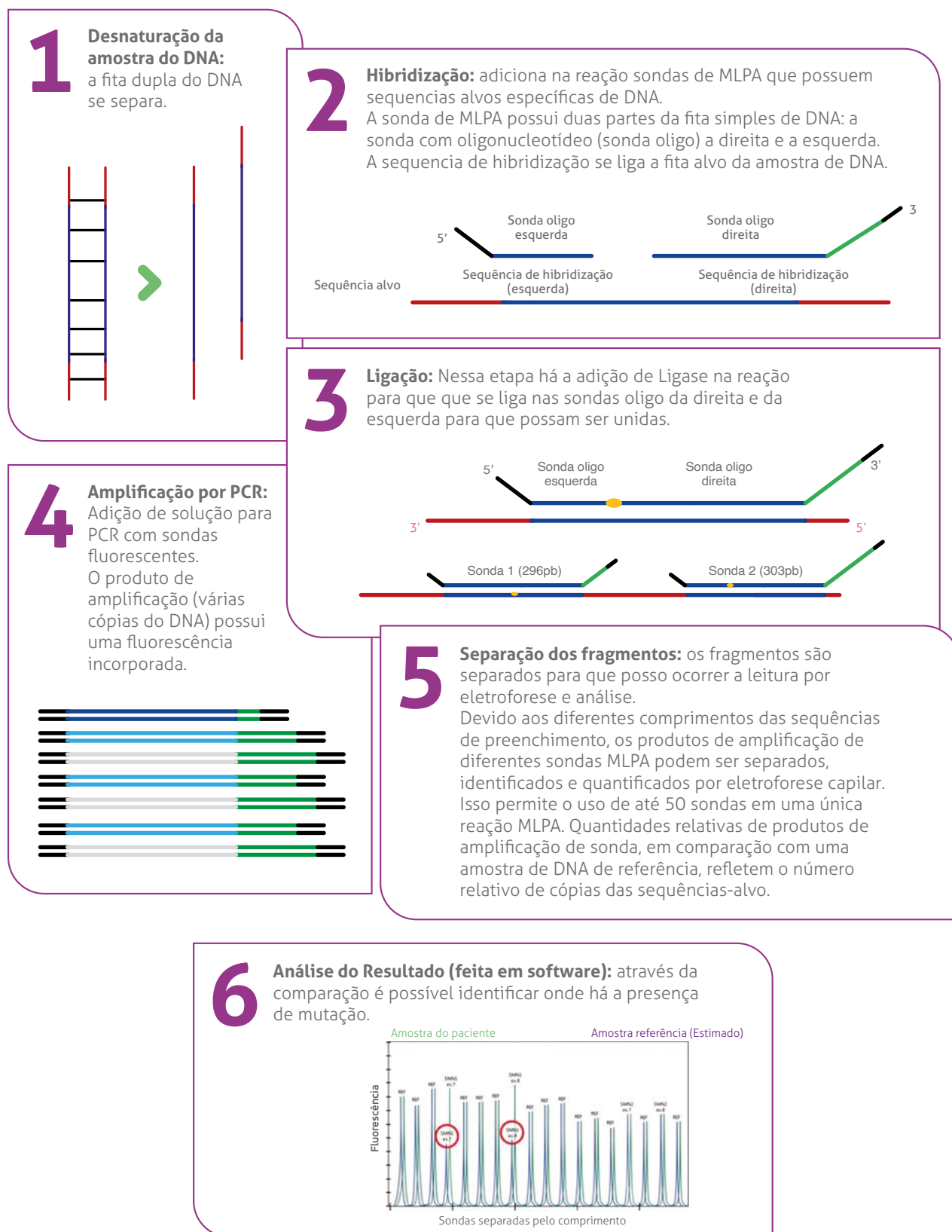
Comece a memorizar essa informação

A síndrome de DiGeorge, que provoca alterações na imunidade celular e malformações faciais e cardíacas, é causada por uma deleção da 22q11.

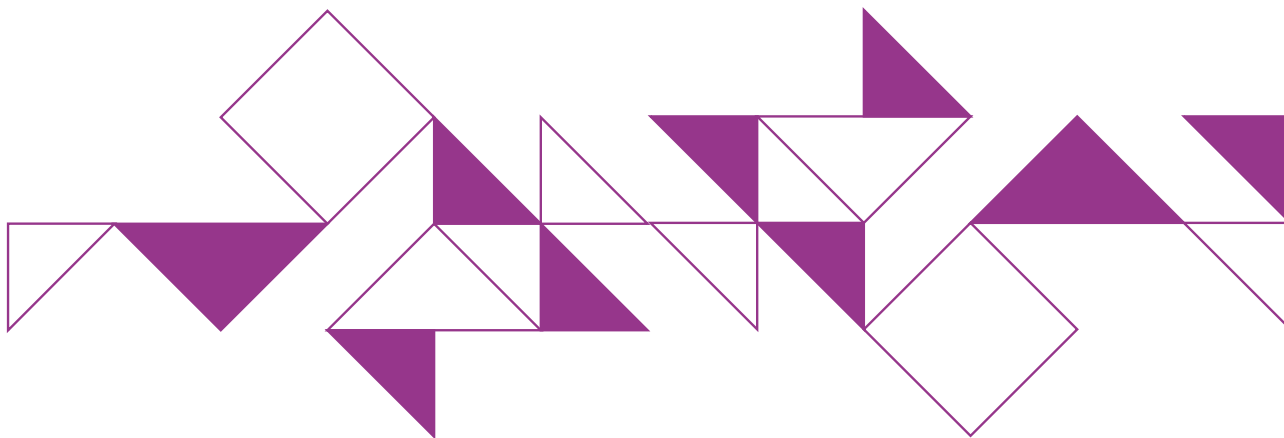


A figura 17 exemplifica todo o processo da técnica.

Figura 17 - Processo de realização da técnica Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação (MLPA)



Fonte: Elaboração própria.



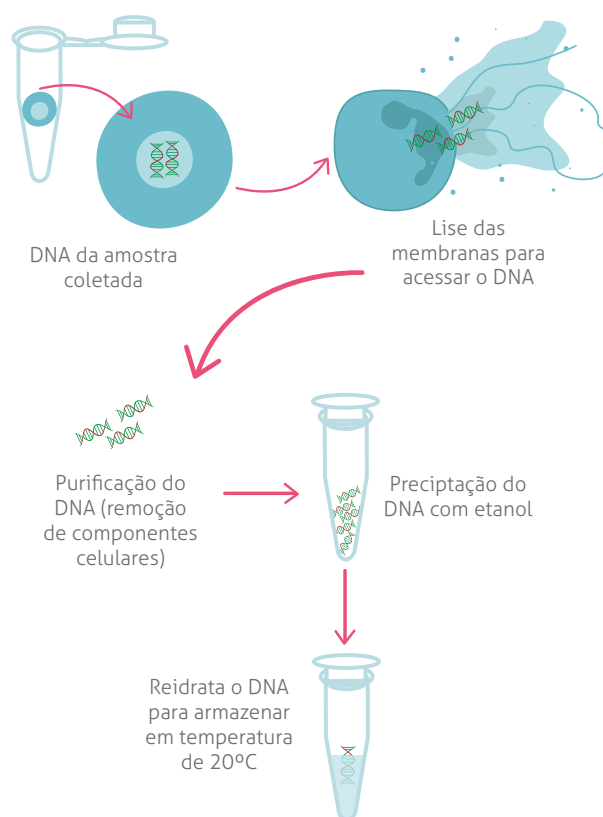
Os avanços da tecnologia permitiram a elaboração da técnica conhecida como Hibridização Genômica Comparativa (CGH-Array), que permite investigar, simultaneamente, milhares de sequências genômicas para a detecção de ganhos (duplicações) e/ou de perdas (deleções) de segmentos cromossômicos (maiores que 100kb) que não são visualizados no exame de cariótipo.

De forma resumida, o experimento consiste na hibridização do material do paciente nos chips de array e, por intensidade do sinal fluorescente, é capaz de determinar as alterações de forma quantitativa. Existem diversas plataformas de array disponíveis, a plataforma CGH array será a que vamos discutir a seguir, pois é uma das mais utilizadas para a investigação cromossômica de alta resolução.

O CGH array constitui uma técnica que, como todas as outras, possui etapas específicas para que se obtenha o resultado da melhor forma. O exame começa quando, após a coleta do material biológico do paciente (amostra de sangue, saliva, vilosidades coriônicas, líquido amniótico ou outras células ou tecidos), é realizada a extração do DNA.

Saiba mais!

Método de extração do DNA de uma amostra

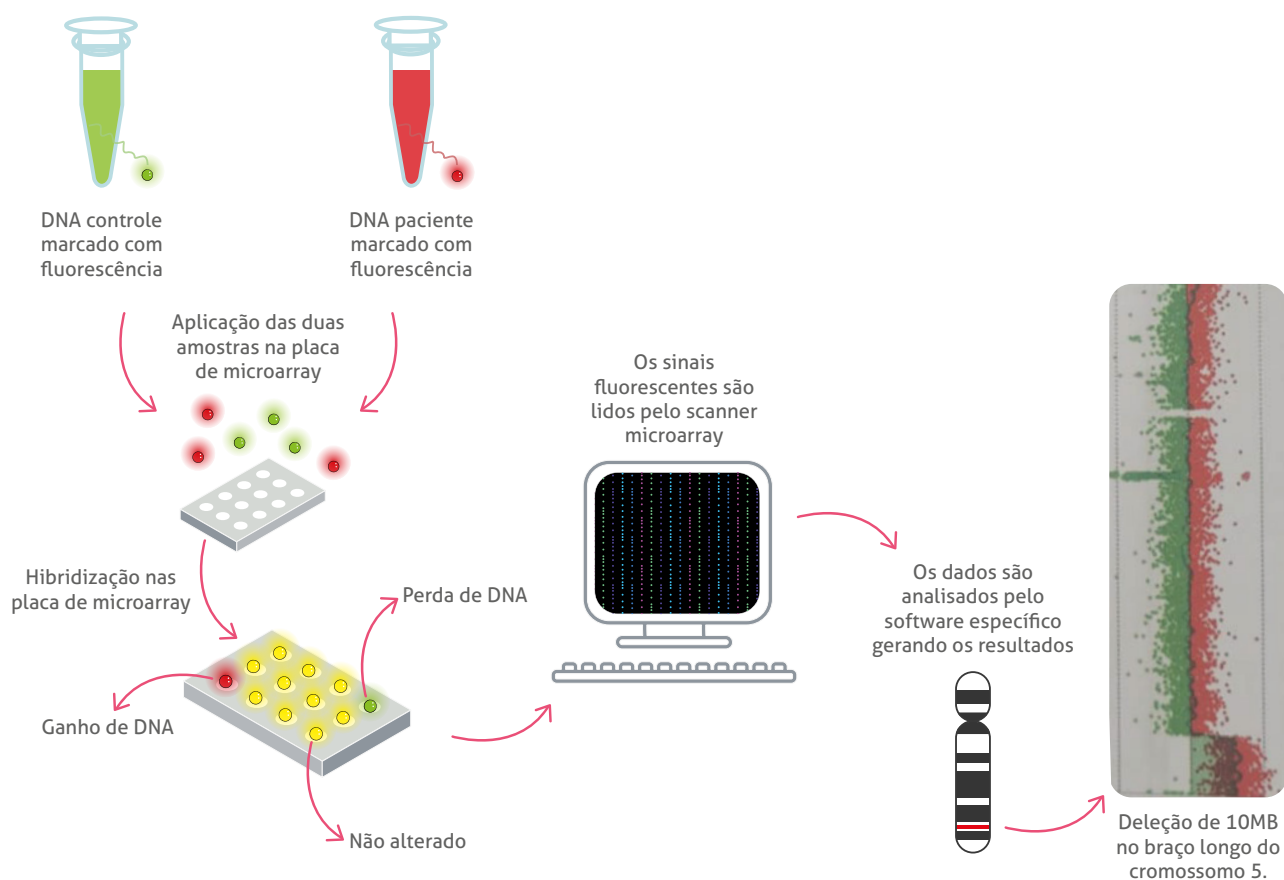


A mesma quantidade de DNA do paciente e a de um DNA de referência (controle) são, então, marcadas com diferentes fluoróforos. Eles são misturados e desnaturados de fita dupla para fita simples. Na próxima etapa, eles são hibridizados em um chip com fragmentos de DNA imobilizados (sondas). Essas sondas cobrem o genoma humano da maneira mais uniforme possível e podem ser personalizadas de acordo com as necessidades da análise.

Os fragmentos de DNA do paciente e do controle competem pela hibridização com as sequências complementares nas sondas de matriz. Um scanner a laser de alta resolução é, então, usado para capturar e quantificar a intensidade do sinal fluorescente de cada cor que hibridizou para cada sonda. Finalmente, a relação entre a intensidade do sinal fluorescente no DNA do paciente e o DNA de referência é calculada para cada sonda do array, obtendo informações sobre o número relativo de cópias de sequências no genoma do paciente em comparação ao genoma de referência.

Toda a informação obtida é interpretada por um software de análise que permite atribuir os dados à respectiva região cromossômica e representá-los (Figura 17).

Figura 18 - Etapas do CGH array



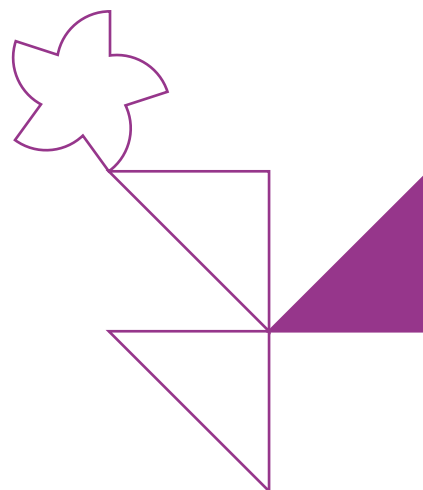
Fonte: Elaboração própria.

Agora que aprendemos as técnicas mais utilizadas para a avaliação dos cromossomos, vamos compreender quais técnicas se usam para avaliar os genes. O tópico a seguir nos apresentará novas técnicas moleculares para mais uma forma de avaliar nosso material genético.

Saiba mais!

Esta tabela apresenta as principais unidades de medida usadas na análise cromossômica

Unidade de medida	Abreviatura	Descrição	Aplicação
Base Par	bp	Unidade básica de informação genética, representando duas bases nucleotídicas emparelhadas no DNA.	Utilizada para medir a extensão de sequências de DNA.
Kilobase	kb	Equivale a 1.000 pares de bases (1.000 bp)	Usada para descrever a localização de genes e sequências em genomas.
Megabase	Mb	Equivale a 1.000.000 pares de bases (1.000 kb)	Usada em análises de grandes regiões genômicas e cromossômicas.
Gigabase	Gb	Equivale a 1.000.000.000 pares de bases (1.000 Mb)	usada em sequenciamento de genomas inteiros.
Centimorgan	cM	Unidade que mede a distância genética entre genes com base na frequência de recombinação.	Utilizada em estudos de mapeamento genético e genética de populações.



2. Genômica e Técnicas de Sequenciamento

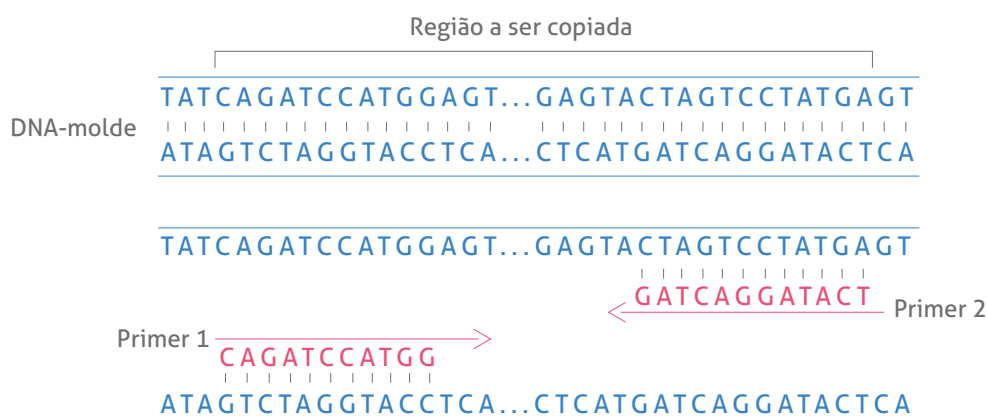
Para realizar a avaliação dos genes, faz-se necessária a leitura da sequência do DNA para determinar sua sequência de nucleotídeos. Esse processo de leitura é chamado de sequenciamento do DNA. Mas, antes de aprendermos as técnicas de sequenciamento, é muito importante começarmos a compreender uma técnica básica da biologia molecular, utilizada no processo de sequenciamento. Essa técnica é conhecida como PCR.

A PCR (reação em cadeia da polimerase), uma técnica da biologia molecular, é utilizada para amplificar (formar várias cópias) pequenas regiões do DNA. Essas regiões devem ser conhecidas, uma vez que se faz necessário um par de primers para sua amplificação.

Saiba mais!

PRIMERS: são sequências únicas de nucleotídeos capazes de se anelar às suas sequências alvo de DNA durante a PCR.

Os primers são desenhados baseando-se no código genético (DNA molde) da espécie que se deseja estudar.



Fonte: Elaboração própria.

Com a PCR, é possível, portanto, que uma sequência de DNA se amplifique muitas vezes, produzindo número de cópias suficientes de DNA para serem analisadas em outras técnicas e também para testes diagnósticos.

É importante destacar que existem componentes importantes que se devem adicionar na reação para que tudo ocorra de forma adequada. Os componentes dessa reação estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Componentes necessários para a realização da PCR*

Componentes	Função	Ilustração esquemática
DNA molde	Contém a sequência a ser amplificada.	
Primers	Sequências específicas para anelar na sequência do DNA molde.	
dNTPs	Bases (A, T, C, G) para complementar a sequência da fita de DNA.	
Taq polimerase	Enzima para realizar o processo de adicionar as bases nitrogenadas.	
Buffer (tampão)	Solução com a capacidade de atenuar a variação dos valores de potencial hidrogeniônico (pH).	
Tubo de PCR	Armazena todo o <i>mix</i> da reação.	
Termociclador	Equipamento que automatiza o processo de amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena amostra.	

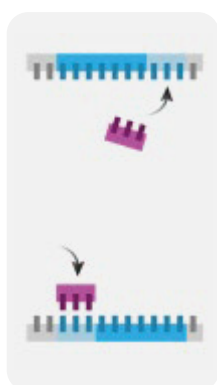
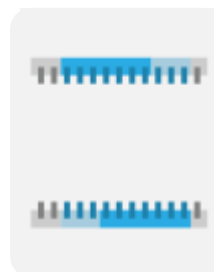
Fonte: Elaboração própria.

Todo o processo possui três principais etapas nominadas de desnaturação, anelamento e extensão. A seguir, na figura 19, será possível evidenciar todos os passos dessa técnica com as respectivas explicações.

Figura 19 - Etapas da PCR

1

Desnaturação: o processo através do qual a dupla fita de DNA se desenrola e separa-se em duas cadeias simples. Geralmente acontece em temperaturas próxima a 95°C.



2

Anelamento: a reação diminui a sua temperatura e os primers conseguem se ligar às suas sequências complementares no DNA molde de fita simples.



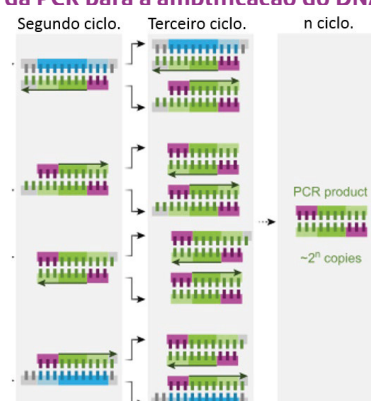
3

Extensão: a temperatura da reação volta a se elevar para que a Taq polimerase estenda os primers, adicionando as bases nitrogenadas, sintetizando novas fitas de DNA.

Fonte: Elaboração própria.

A finalização dessas três etapas, pela primeira vez, é chamada de primeiro ciclo. Realizam-se vários ciclos para que o processo se repita, assim, se faz possível a obtenção de muitas cópias do DNA. Podemos ver esse processo na figura 20.

Figura 20 - Esquema de repetição dos ciclos da PCR para a amplificação do DNA



Fonte: Elaboração própria.

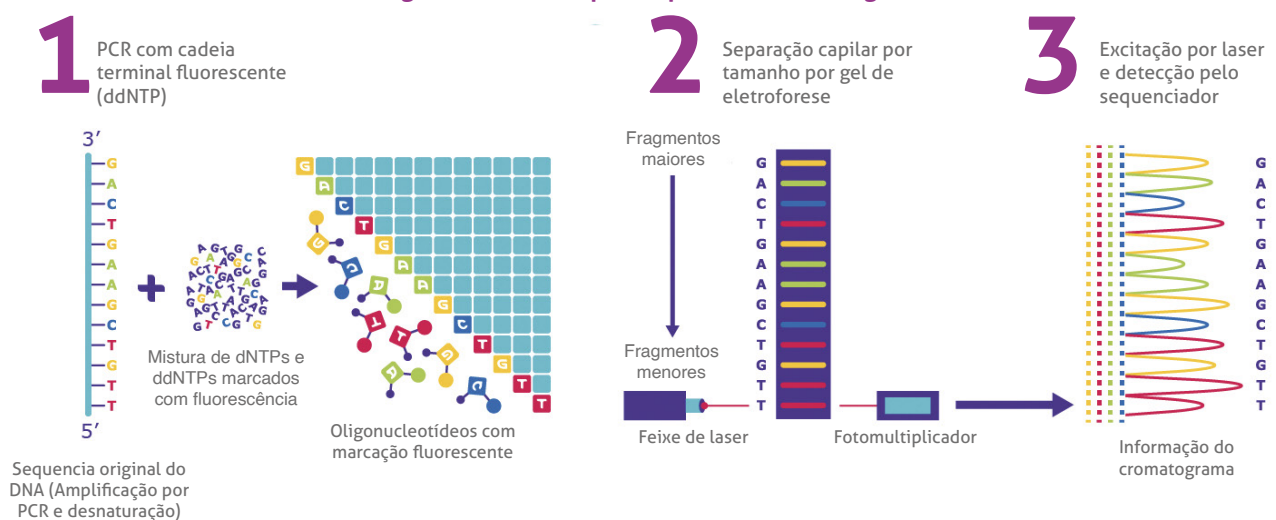
Conhecendo a técnica da PCR, podemos seguir adiante para discutirmos sobre o sequenciamento do DNA. Essa técnica tem, como objetivo, determinar a sequência de nucleotídeos (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) de regiões específicas já conhecidas.

O primeiro sequenciamento de um genoma completo foi publicado em 1977 pelo duplo ganhador do Prêmio Nobel de Química Frederick Sanger. Isso foi possível graças aos avanços contínuos nas áreas da bioquímica e da genética molecular, mas também em outras áreas, como a nanotecnologia e a computação.

Nesse procedimento, tudo se inicia com a realização de uma PCR para que a amostra seja amplificada. De forma sintetizada, o Sequenciamento de Sanger, portanto, se inicia após termos os fragmentos de diversos tamanhos diferentes do DNA que se deseja sequenciar, advindos da PCR. Ao final de cada fragmento, adiciona-se uma marcação fluorescente com a coloração específica de cada base nitrogenada. Os nucleotídeos vão sendo inseridos, até que, em determinado momento, cada base nitrogenada possui uma fluorescência diferente, para que se distingam na leitura do resultado.

Após essa etapa, o material passa ao sequenciador, para que se separem os fragmentos por capilaridade em eletroforese. Os menores conseguem passar pela eletroforese mais facilmente e vão montando a sequência, até chegar aos fragmentos maiores. Dessa forma, cada fragmento é excitado com um laser e há a detecção dos fragmentos através da leitura de cores da fluorescência emitida. A figura 21 mostra um esquema de todo o processo de Sequenciamento Sanger.

Figura 21 - Técnica por Sequenciamento Sanger



Como pudemos evidenciar na figura 13, o resultado é o sequenciamento de cada base formando um pico com sua respectiva cor e a sequência do material genético, a partir da qual é possível identificar variantes, pequenas inserções ou deleções pontuais. Na figura 14, temos um exemplo de eletroferograma evidenciando uma variante.



Fonte: Elaboração própria.

Embora ainda seja eficaz para a detecção de mutações, existem algumas limitações no sequenciamento Sanger, que fizeram as tecnologias novas serem mais utilizadas, como o NGS — Sequenciamento de Nova Geração —, o qual permite o sequenciamento mais rápido e em larga escala do DNA.

Existem diferentes protocolos para realizar o NGS, mas, de forma geral, para entendermos como é possível sequenciar, simultaneamente, muitos pares de base, vamos explicar as etapas para comparar a diferença do NGS para o sequenciamento Sanger.

Assim como no sequenciamento Sanger, o primeiro momento inicia-se coletando a amostra que interessa sequenciar e realizando a extração do DNA. Dependendo de cada empresa, ocorre a necessidade de uma quantidade de DNA extraído, não podendo ter nem menos, nem mais, para que o procedimento aconteça da forma adequada.

Outra etapa importante é a preparação da biblioteca, de fato, a preparação da amostra para que seja sequenciada com todos os adaptadores necessários. O sequenciamento, de fato, a leitura do material genético, realiza-se pelo sequenciador e, então, pode-se realizar a análise dos dados gerados. O preparo da biblioteca e a técnica de sequenciamento NGS dependem de protocolos diferentes existentes no mercado.

Devido à quantidade de dados gerados, toda a análise dos resultados é feita por profissionais de conhecimento amplo em bioinformática.

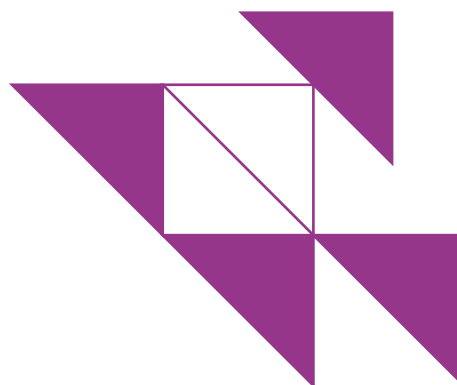
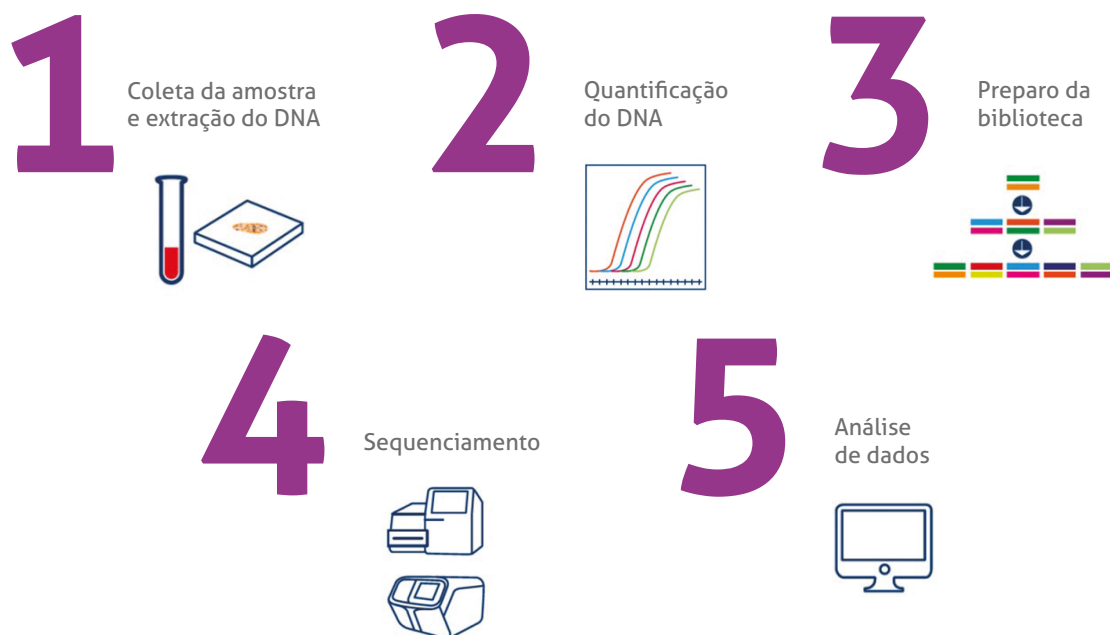


Figura 23: Processo de realização do NGS



Fonte: Elaboração própria.

Com a evolução da técnica do NGS, conseguimos, hoje, sequenciar o exoma (Whole Exoma Sequence – WES), ou o genoma (Whole Genoma Sequence – WGS), dependendo da necessidade das informações que se desejam obter. De forma exemplificada, WES é o sequenciamento do exoma completo (regiões codificantes), sendo possível analisar, em média, cento e oitenta mil éxons a fim de buscar as variantes que se podem relacionar com o fenótipo patológico de um indivíduo.

Não se faz necessário selecionar genes alvos uma vez que, com essa fórmula de análise, é possível ter o sequenciamento de quase todos os vinte mil genes, contribuindo para o diagnóstico de doenças que, ainda, não têm uma hipótese diagnóstica bem definida, ou por quadros inespecíficos, que necessitem a busca de genes diferentes dos que existem em painéis comumente utilizados.

Com relação ao WGS, trata-se de uma técnica laboratorial na qual se obtêm todas as regiões, codificantes e não codificantes, do genoma. Ele fornece um mapa completo e abrangente da composição genética de uma pessoa e permite que seja realizada uma análise extensa de todos os genes. O sequenciamento do genoma completo é uma tecnologia de teste genético que obtém dados abrangentes sobre cada gene.

A tabela 3 aponta algumas comparações entre o Sequenciamento Sanger e o NGS.

Tabela 3 - Comparação entre o método de Sequenciamento Sanger e o NGS

Sanger	NGS
Custo mais baixo comparado com os demais	Custo mais elevado
Metodologia utilizada em variantes pontuais, regiões conhecidas e estabelecidas	Metodologia utilizada em estudos de larga escala: WGS ou WES
Sem problemas de armazenamento de dados	Grande número de dados gerados: problema de armazenamento
Análise simples, contando apenas com sequência e referência	Profissional qualificado para análise dos dados

Fonte: Elaboração própria.

É importante lembrar que não há superioridade entre uma técnica ou outra, uma vez que a escolha pela técnica se faz de acordo com a resposta que se busca. Muitos laboratórios utilizam a técnica de Sanger para confirmar resultados de mutação pontual obtidos no NGS.

Mais do que compreender o processo de análise, importa muito saber como os resultados são gerados e, assim, ter a capacidade de realizar a interpretação correta deles para que condutas clínicas, por exemplo, sejam realizadas de forma coerente, sem causar prejuízo ao paciente e a seus familiares.

Essa é a intenção da medicina genômica, gerar conhecimento sobre o genoma humano para entender, diagnosticar, prevenir e tratar doenças de forma mais precisa e personalizada. Com o crescente avanço das tecnologias de análise do material genético, a medicina genômica permite que profissionais da saúde avaliem as predisposições genéticas de cada

paciente, identificando variações genéticas que podem influenciar tanto o risco de desenvolvimento de doenças quanto a resposta a diferentes tratamentos.

Nesse sentido, um resultado de qualquer técnica molecular traz informações valiosas para relacionar com o fenótipo presente no indivíduo e em sua família. Mas essas informações vêm descritas de forma específica, com linguagem científica e padronizada. Como vimos anteriormente, o cariótipo, por exemplo, possui uma forma específica de representar a presença de alguma alteração nos cromossomos.

A análise da sequência do DNA, também, possui formas padronizadas para descrever a presença de mutação, chamadas variantes. As classificações de variantes podem ser patogênicas, benignas ou de significado clínico desconhecido. A seguir, vamos discutir o processo de análise das variantes genéticas para que a compreensão dos resultados advindos das técnicas moleculares seja adequada.

3. Variantes Genéticas na prática

Com o montante de informações advindos do NGS, os bioinformatas utilizam algoritmos para tentar explorar e compreender melhor as informações do material genético. Para organizar todas essas informações, a análise *in silico* é uma área da ciência que utiliza as ferramentas computacionais as quais conseguem, por meio do uso de banco de dados, classificar os dados obtidos.

As variantes identificadas são classificadas de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Americano de Genética Médica (ACMG). Essas diretrizes possuem 28 critérios diferentes aos quais são atribuídos diferentes pesos, em função das evidências disponíveis sobre a variante em questão.

Vamos recordar?

Variante genética: são alterações observadas na comparação de uma mesma região entre dois genomas. A variante é resultado de uma variação genética, um processo natural pelo qual os indivíduos se diferem, é o que nos tornam seres únicos do ponto de vista genético. O que é importante saber é se as variantes causam ou não implicações na saúde.



Os critérios estabelecidos pela ACMG permitem avaliar a significância clínica, descrita por cinco classes: Classe 1 - Variante benigna; Classe 2 - Variante provavelmente benigna; Classe 3 - Variante de significado incerto; Classe 4- Variante provavelmente patogênica; Classe 5- Variante patogênica (Harrison et al, 2019).

Na tabela 4, as cinco classificações estão expostas com seus respectivos significados, auxiliando no entendimento delas.

Tabela 4 - Classificação das variantes e suas implicações

Classe	Classificação da Variante	Implicação
1	Benigna	Não geram, ou não aumentam, o risco do desenvolvimento de doenças.
2	Provavelmente benigna	Não é esperado que ocasionem, ou que aumentem, o risco do desenvolvimento de doenças.
3	Significado desconhecido	Informações disponíveis não são suficientes para que a classificação como benigna ou patogênica seja feita.
4	Provavelmente patogênica	Alta probabilidade (90%) no desenvolvimento, ou no aumento, da susceptibilidade de desenvolvimento de doenças.
5	Patogênica	Associadas diretamente ao desenvolvimento ou ao aumento da susceptibilidade de desenvolvimento de doenças.

Fonte: Elaboração própria.

A classificação de patogênica para a variante é realizada através dos níveis de evidência que ela possui, considerando-se os dados populacionais, se ela já foi descrita em banco de dados, se já se realizaram tanto a análise in silico quanto os ensaios funcionais em laboratórios. Além disso, os níveis de evidência relacionados à análise de segregação, ou se foi reportado caso de mutação de novo, como também outros dados que possam estar presentes na literatura.

Saiba mais!

Uma mutação de novo é uma alteração genética que ocorre pela primeira vez em um indivíduo e não foi herdada de nenhum dos pais.

Essas mutações podem surgir espontaneamente durante a formação dos gametas (óvulos ou espermatozoides) dos pais ou durante o desenvolvimento embrionário do indivíduo.

A análise de segregação é um método utilizado para entender como uma mutação ou variante genética é transmitida dentro de uma família ao longo das gerações. Essa análise ajuda a determinar se uma condição genética está segregando de forma dominante, recessiva, ligada ao X, entre outros padrões de herança (veja no material complementar os padrões de herança).

Entender a classificação das variantes permite discutir, de forma adequada, os dados, relacionando-os com a história pessoal e familiar, favorecendo a realização de um aconselhamento genético (conceito que será visto no módulo 6) de forma clara e coerente frente aos conceitos moleculares e às condutas da prática clínica.

Agora que sabemos que as variantes encontradas possuem uma classificação, podemos discutir quais as variantes e as implicações do ponto de vista molecular que podem, ou não, causar as alterações fenotípicas.

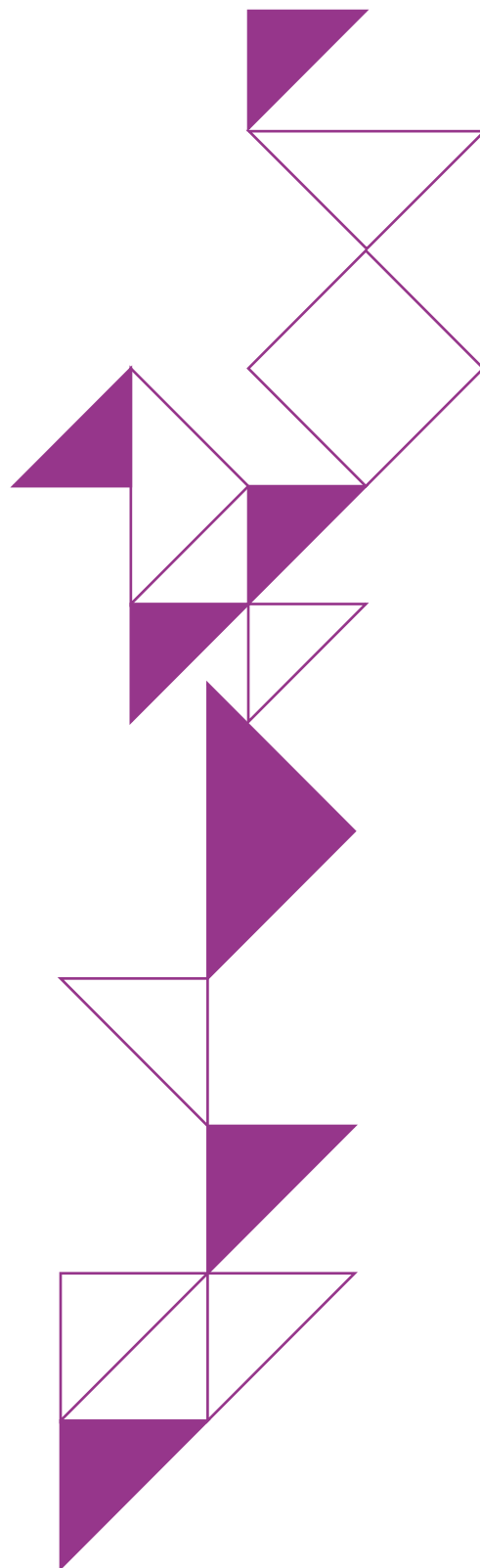
Tipos de Variantes

Variante de nucleotídeo único (SNV – Single nucleotide variants)

Variante de um nucleotídeo único quer dizer que há alteração de um único nucleotídeo na sequência do DNA, ocorrendo a troca de um nucleotídeo por outro. Quando ocorre uma SNV em uma região codificante (nos éxons) do gene, diferentes variantes podem acontecer, resultando em consequências diversas na proteína codificada.

Quando acontece uma substituição de nucleotídeos que não resulta em uma mudança no aminoácido, chamamos de variante sinônima ou silenciosa. Isso pode acontecer uma vez que vários códons codificam o mesmo aminoácido e, assim, a proteína é codificada, não perdendo a sua função. Porém, se a substituição de nucleotídeos resulta na substituição de aminoácido, podemos ter, como resultado, uma variante patogênica, dependendo do efeito que essa substituição cause na função e na estrutura da proteína. Nesse caso, chamamos de variante missense ou não sinônima.

Em algumas situações, a substituição de nucleotídeos pode gerar um códon de parada, levando ao término prematuro da síntese proteica e resultando em uma proteína provavelmente não funcional. Nessas circunstâncias, essas variantes são denominadas nonsense ou variantes de ganho de parada.



A seguir, podemos evidenciar, na tabela 5, três formas dessas variantes.

Tabela 5 - Tipos de Variantes de nucleotídeo único e suas consequências*

	Sequência de DNA referência sem variante	Variante sinônima ou silenciosa	Variante missense ou não sinônima	Variante nonsense ou de ganho de parada
DNA				
mRNA				
Proteína codificada	Lisina 	Lisina 	Arginina 	Término da Proteína 

Fonte: Elaboração própria.

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Os SNPs são a alteração de um único nucleotídeo na sequência do DNA e encontram-se em, pelo menos, 1% da população, constituindo a forma mais comum de variações genéticas nos humanos.

Um indivíduo possui, aproximadamente, de 4 a 5 milhões de SNPs em seu genoma e, dependendo em qual região, um SNP pode acarretar consequências. Todavia sabe-se que a grande maioria dos SNPs pode justificar como o organismo funciona, pode associar-se a doenças e, até mesmo, ser marcadores de melhores prognósticos em algumas situações (Lopes, 2021).

Variantes Indels

As variantes Indels são as deleções e as inserções de bases consecutivas na

sequência do DNA. As variantes do tipo Indels são, depois dos SNPs, as mais frequentes no genoma humano.

Quando essas variantes ocorrem dentro das regiões codificantes, podem causar modificações na proteína e podem ser de dois tipos: as variantes com mudança no quadro de leitura (frameshift) e as sem mudança no quadro de leitura (não frameshift).

As variantes frameshift ocorrem quando há a inserção ou a deleção de um número de nucleotídeos que não é múltiplo de três, afetando a leitura do código genético. Isso pode resultar na inclusão de um stop códon (sinal de parada) ou formar um alongamento da proteína. Já quanto às variantes indels do tipo não frameshift, ocorrem quando há a inserção ou a deleção de nucleotídeos múltiplos de três pares de base, resultando na inserção ou na deleção de um ou mais aminoácidos, mantendo a sequência da proteína inalterada.

Variação do número de cópias (CNV – Copy number variation)

As CNVs são segmentos genômicos maiores que 50pb que diferem em números de cópias e se caracterizam por duplicações (ganho de material genômico) ou deleções (diminuição de material genômico) (Zarrei et al, 2015).

Essas variações de número de cópias possuem implicações, dependendo da região envolvida, podendo representar variantes benignas ou estar associadas a doenças mais complexas. Por isso é fundamental a relação fenótipo e genótipo para a melhor compreensão.

Assim como as alterações cromossômicas, a descrição dos achados do sequenciamento se realiza de forma padronizada e específica.

A descrição, sempre, traz a localização e a consequência da alteração. Por exemplo, ao escrever c.1595G>A (p.Cys532Tyr), podemos entender que houve uma substituição da base Guanina por Adenina, no DNA ("c." indica região de DNA) na região 1595 (localização), resultando na substituição dos aminoácidos, de uma Cisteína (Cys) por uma Tirosina (Tyr).

Na tabela 6, expõem-se os símbolos que podem ser encontrados com maior frequência em resultados de sequenciamento.

Tabela 6: Indicadores da sequência referência no material genômico

Local	Indicador
Para uma sequência de DNA codificadora (gene)	c.
Para uma sequência de referência genômica linear	g.
Para uma sequência de DNA mitocondrial	m.
Para uma sequência de DNA não codificante	n.
Para uma sequência de referência de RNA (transcrição)	r.
Para uma sequência de proteína	p.

Fonte: Elaboração própria.

Também existem códigos para determinar as alterações causadas nas variantes, como substituição, designada por >, ou deleção, designada por del. Na tabela 7, podem-se verificar os códigos utilizados com mais frequência e seus respectivos significados.

Tabela 7: Alteração identificada no sequenciamento e sua representação simbólica para a descrição.

Alteração	Símbolo	Explicação
Substituição (bases)	>	Utilizado para indicar substituição. Exemplo: g.12345A>T substituição de um A por T.
Intervalo	-	Indica um intervalo entre posições. Exemplo: g.12345_12678del
Mais de uma alteração em um alelo	;	Utilizada para separar variantes e alelos.
Diferentes transcritos	,	Utilizada para separar diferentes transcritos/proteínas sintetizados a partir de um alelo.
Mosaicismo	/	Indica mosaicismo.
Incerteza	?	Indica incerteza na posição do nucleotídeo ou aminoácido; Exemplo: g.(?_234567)_(345678_?)del
Sinônimo	=	Indica variante silenciosa; Exemplo p.Fen344=
Posição de um nucleotídeo	+	Usado para numerar a posição de um nucleotídeo em relação a outro. Nucleotídeos na extremidade 5 de um íntron são numerados em relação ao último nucleotídeo do exon diretamente a montante, seguido por um "+" (mais) e sua posição no íntron. Exemplo: c.123+45A>G
Posição de um nucleotídeo	-	Nucleotídeos na extremidade 3 de um íntron são numerados em relação ao primeiro nucleotídeo do éxon diretamente a jusante, seguido por um "-" e sua posição fora do intron. Exemplo: c.124-56C>T
Incertezas	()	Usados para indicar incertezas e predições
Alelo	[]	Indica alelos, que inclui múltiplas sequências inseridas em uma posição e inserções de uma segunda sequência de referência.
Deleção	del	Indica uma deleção; Exemplo: c.356_369del
Duplicação	dup	Indica uma duplicação; Exemplo: c.49dupA
Inserção	ins	Indica uma inserção; Exemplo: c.39_40insG
Inversão	inv	Indica uma inversão; Exemplo: c.76_83inv
Stop codon	*	Indica um códon de terminação de tradução. Exemplo c.*43C>T ou p.Trp41*
Frameshift	Fs	Indica um <i>frameshift</i> ; Exemplo: p.Arg456GlyfsTer17
Metilação	Met	Indica uma metilação

Fonte: Elaboração própria.

4. Análise das “Ômicas”

Até o momento, aprendemos sobre a genômica, cujo objetivo é identificar genes específicos, variantes genéticas e mutações associadas a características ou doenças. Mas existem outras análises “ômicas” com a intenção de estudar, de forma abrangente e integrada, os diferentes níveis biológicos e as moléculas dentro de sistemas biológicos complexos, como organismos ou populações.

Saiba mais!

O termo “ômica” deriva do sufixo “-oma”, que se refere a um conjunto completo de moléculas, como o genoma (todo o material genético de um organismo).

As técnicas ômicas têm-se tornado fundamentais em biologia e medicina para entender a complexidade biológica e para aplicar esses conhecimentos em diagnósticos, em tratamentos e em estudos de doenças. Além da genômica, as análises do transcriptoma conseguem avaliar moléculas de RNA mensageiro (mRNA) em uma célula, em determinado momento, com o objetivo de entender a regulação da expressão gênica e como os genes são ativados ou desativados em diferentes condições.

Outras análises que podemos citar são a proteômica que compreende todas as proteínas expressas em uma célula, ou organismo, podendo determinar a expressão das proteínas, e a metabolômica que tem o foco nos metabólitos (pequenas moléculas) presentes em uma célula, tecido ou organismo, ajudando a entender os processos bioquímicos e as vias metabólicas, fornecendo uma visão detalhada do estado fisiológico.

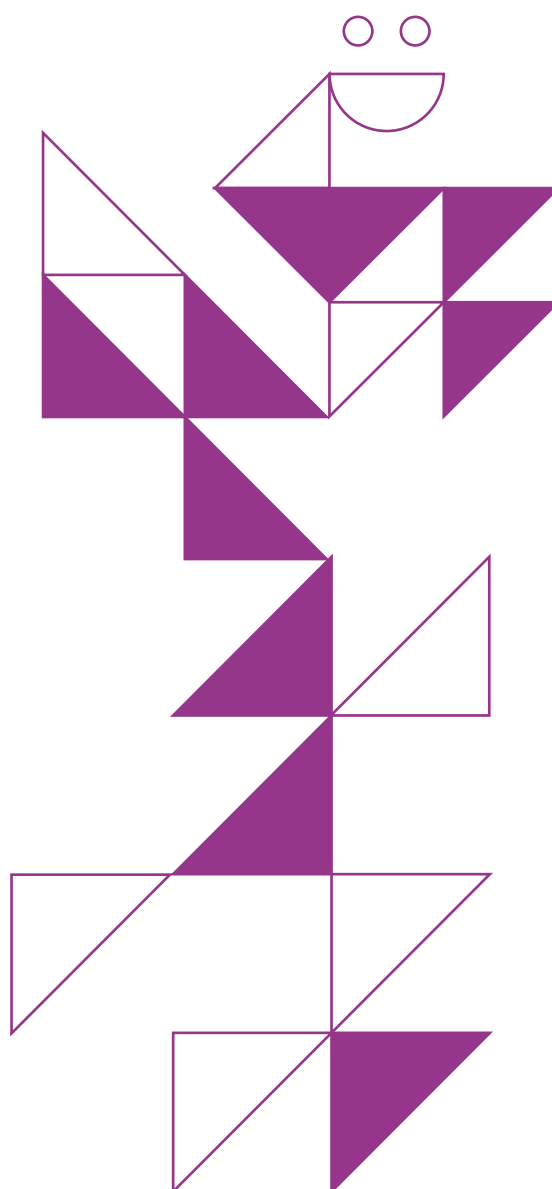
Vimos, no Módulo 1, alguns conceitos de epigenética, que também está presente nas análises das “ômicas”, sendo chamada de epigenômica. O objetivo desses estudos é avaliar as modificações epigenéticas, como metilação do DNA e modificações de histonas, que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA. As alterações epigenéticas são importantes na regulação da expressão gênica e estão associadas a diversas doenças.

Na prática clínica, a importância dessas análises está presente em diversas situações que auxiliam na visão integrada e global dos processos biológicos, indo além da análise isolada de um gene ou de uma proteína.

Importância das análises ômicas

A principal importância das análises ômicas é proporcionar uma visão integrada e global dos processos biológicos, indo além da análise isolada de um gene ou de uma proteína. Isso permite:

- **Identificação de biomarcadores:** Auxilia na identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce, o prognóstico e o monitoramento de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas.
- **Medicina de precisão:** Personaliza tratamentos com base no perfil molecular do paciente, permitindo abordagens mais eficazes e com menos efeitos colaterais.
- **Descoberta de novas terapias:** Facilita a descoberta de novas vias de tratamento ao revelar interações entre diferentes níveis de moléculas, como interações entre genes, proteínas e metabólitos.
- **Estudos de doenças complexas:** Fornece uma abordagem abrangente para entender doenças multifatoriais, como o câncer, e doenças autoimunes, que envolvem múltiplos genes e vias biológicas.
- A integração de dados das diferentes ômicas possibilita uma análise sistêmica e global da saúde e das doenças, promovendo avanços na pesquisa científica e na prática clínica.



5. Aplicação clínica da Genética e da Genômica – Testes genéticos e tratamentos

Como já aprendemos os conceitos básicos de genética e as técnicas moleculares para a avaliação do material genético, podemos compreender como todo esse conhecimento pode auxiliar na prática clínica dos profissionais de saúde para realizar orientações quanto a questões de hereditariedade na família, quanto a ações de prevenção e a práticas de tratamento mais personalizadas.

O desenvolvimento das técnicas moleculares, como vimos anteriormente, permitiu, portanto, a realização dos testes genéticos. O teste genético (TG) tem, como definição clássica, feita por Holtzman & Watson em 1997, a análise do DNA, do RNA, dos cromossomos, das proteínas e de certos metabólitos, com a intenção de detectar condições herdáveis para finalidades clínicas de acompanhamento de indivíduos e de famílias. De forma mais específica, essa análise visa a identificar quais são as alterações na sequência do DNA ou na estrutura cromossômica. Além disso, é possível realizar a análise de RNA como resultado da expressão gênica, ou por meio de análise bioquímica, para medir a produção específica de proteínas.

Na prática clínica, podemos destacar, portanto, que a utilização do TG permite diagnosticar doenças de recém-nascidos, crianças ou adultos, prever riscos para condições específicas ou obter informações que podem ser usadas para personalizar tratamentos. Além disso, também pode ser usado para determinar a filiação biológica de uma criança por meio de teste de paternidade de DNA, para prever, amplamente, a ascendência de um indivíduo e, também, na prática forense.

Na atualidade, o recurso do TG encontra-se, cada vez mais, frequente, dado o grande desenvolvimento de pesquisas da relação fenótipo e genótipo e, também, a diminuição de custos. Não somente indivíduos acometidos por patologias buscam a resposta com o uso do teste genético, mas também indivíduos saudáveis que buscam como realizar atitudes preventivas personalizadas, a partir do conhecimento de suas informações moleculares.

O grande número de informações que se podem obter a partir do teste genético abre espaços para novas discussões desde os aspectos preventivos, os tratamentos e as justificativas por fenótipos tão frequentes em algumas famílias. Todas essas informações precisam ser discutidas em um contexto educativo e seguro antes da realização do teste, para que não ocorram desconfortos e conflitos de informação no momento em que se revele o resultado do teste. Por isso, o teste genético deve ser realizado em um contexto de aconselhamento, do qual a etapa se denomina aconselhamento genético pré-teste (veremos sobre aconselhamento genético no módulo 6).

A seguir, vamos discutir quais as principais aplicações e quais os tipos de teste genético mais utilizados no cenário clínico, bem como ressaltar alguns pontos importantes que devem ser elaborados entre profissionais, usuários do serviço de saúde e seus familiares antes da realização do TG.

Aplicação clínica do teste genético

São diversas as formas como se pode aplicar o teste genético na prática clínica, beneficiando indivíduos que possam estar em risco aumentado para alguma condição genética específica. O conhecimento molecular, adicionado das informações clínicas e da história familiar, podem nortear além de condutas terapêuticas, estratégias de prevenção e de diminuição de risco.

A seguir, vamos expor algumas das formas em que o teste genético pode ser aplicado; a cada uma delas, a classificação se dá de acordo com o seu propósito (Iowa Institute of Human Genetics):

- a. Teste genético clínico:** realizado para ter o perfil genético do indivíduo como informação adicional sem uma finalidade terapêutica ou diagnóstica específica.
- b. Teste genético diagnóstico:** realizado para encontrar a causa de uma doença ou de sintomas já presentes no indivíduo.

- c. Teste genético pré-sintomático (preditivo):** antes de o indivíduo expressar algum sintoma, para descobrir se há risco para o desenvolvimento de certo tipo de doença, ou se há alguma variante que poderá ser passada para descendentes futuros, colocando-os em risco também.
- d. Teste genético de detecção do portador:** é um teste que identifica mutações em genes relacionados a doenças recessivas. Se os dois membros do casal forem testados, o resultado poderá fornecer informações sobre o risco de ter um filho com uma condição genética recessiva.
- e. Teste genético pré-natal:** é um teste durante a gravidez para ver se o bebê terá uma doença.
- f. Teste genético do recém-nascido:** um teste realizado de um a dois dias após o nascimento do bebê, para ver se ele tem certas doenças.
- g. Teste genético farmacogenômico:** para descobrir o melhor remédio e a melhor dose para o indivíduo com base em suas variantes de DNA.

A genética molecular e seu vasto avanço para auxiliar a prática clínica resultaram em grande aumento no número de distúrbios e de tratamentos para os quais os testes genéticos estão disponíveis. É importante ressaltar, no entanto, que, mesmo com tantos avanços no mundo das metodologias moleculares, o TG, sozinho, não garante uma medicina personalizada de qualidade; a avaliação da história pessoal e familiar e as questões biopsicossociais, também, entram no contexto da avaliação.

Toda a história pessoal e familiar, junto com as informações moleculares, torna todo o quadro mais completo e relevante para indivíduos e seus familiares, fazendo, da medicina de precisão, uma abordagem além dos genes, de tudo o que envolve o corpo físico e o meio onde vive. O bom relacionamento com o paciente mostra-se muito importante para explicar os motivos do teste, os resultados do teste, o plano de tratamento e as implicações para outros membros da família. O padrão de atendimento, hoje, a pacientes com doenças genéticas requer a colaboração entre os prestadores de cuidados primários, os especialistas em outros níveis de atenção e os laboratórios.

Nesse contexto, no qual o teste genético é solicitado após uma anamnese e a construção do heredograma da forma mais completa possível e com a avaliação de risco junto com o propósito bem definido da obtenção de informações moleculares e suas implicações, o profissional de saúde também precisa compreender quais as melhores técnicas para acessar as informações genéticas.

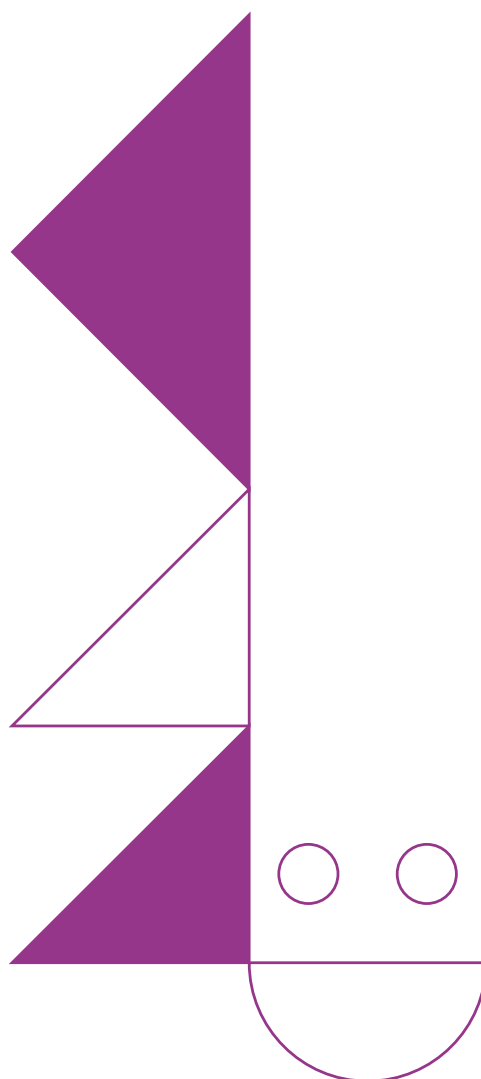


Tabela 8: Tipos de técnicas moleculares para teste genético e exemplos de uso na prática clínica

Teste Genético	Quando é solicitado	Exemplo de uso	Justificativa
Cariótipo	Suspeita de alterações cromossômicas grandes ou estruturais	Identificação de translocações em leucemias, detecção de aneuploidias em tumores.	Permite observar grandes alterações cromossômicas, como translocações e deleções, que podem ser indicadores de certos tipos de câncer hematológico.
FISH	Detecção de alterações cromossômicas específicas	Pesquisa de amplificação do gene HER2 em câncer de mama, estudo de deleções no gene MYC em linfomas.	Usando sondas fluorescentes, é possível detectar amplificações e deleções específicas em genes envolvidos na progressão tumoral e na agressividade de cânceres.
MLPA	Detecção de deleções e duplicações de genes específicos	Detecção de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (risco de câncer de mama e ovário), pesquisa de duplicação no gene MYH7 em cardiomiopatia hipertrófica.	Ideal para a detecção de alterações em número de cópias em genes específicos, sendo útil para risco hereditário, em oncologia, e alterações estruturais em genes cardíacos.
Array-CGH	Suspeita de ganho ou perda de material genético submicroscópico	Investigação de ganho de material genético em tumores sólidos, deleções em genes associados a síndromes cardíacas congênitas.	Permite uma análise detalhada de ganhos e de perdas de pequenas regiões cromossômicas, o que auxilia na caracterização molecular de alguns tumores e de condições cardíacas congênitas.
Sanger	Teste de confirmação e de mutações específicas em genes	Confirmação de variantes patogênicas nos genes TP53 (câncer), MYBPC3 (cardiomiopatia hipertrófica).	Sequenciamento direcionado e preciso para identificar mutações específicas conhecidas, usado para a confirmação de variantes identificadas por outros testes, como NGS.
NGS painel genes específico	Pesquisa ampla ou em painel de genes, alta suspeita de doença genética específica	Painel de câncer hereditário ou painel de cardiomiopatias.	Sequência de múltiplos genes ao mesmo tempo, sendo útil em casos de síndromes hereditárias no câncer e cardiopatias, proporcionando uma visão ampla das variantes genéticas.
Exoma	Suspeita de doença genética sem um gene específico conhecido	Diagnóstico de câncer hereditário em famílias sem gene específico conhecido, identificação de variantes em cardiopatias hereditárias.	Sequencia regiões codificantes (exons) em todo o genoma, sendo útil para doenças hereditárias com alta heterogeneidade genética e, em casos, sem suspeita genética específica.
Genoma	Análise genética completa para condições complexas	Pesquisa de mutações raras em cânceres familiares, investigação genética completa em cardiopatias hereditárias de etiologia desconhecida.	Sequencia o genoma completo, incluindo regiões codificantes e não codificantes, útil para condições complexas onde a causa genética é desconhecida ou rara.

Fonte: Elaboração própria.

Além dos testes genéticos para auxiliar nas questões diagnósticas, compreender as informações do material genético de cada indivíduo permite o avanço de opções terapêuticas personalizadas, como terapias alvos na oncologia. Testes genéticos realizados em tumores permitem avaliar mutações em genes específicos, como os genes EGFR, ALK e BRAF, exemplos de tratamentos direcionados a pacientes com câncer de pulmão e com melanoma. Essas terapias têm, como alvo, moléculas ou caminhos celulares específicos do tumor, oferecendo maior precisão e menos toxicidade em comparação com a quimioterapia convencional.

Existe, também, a atuação da genômica para realizar avaliação do metabolismo de medicamentos específicos em indivíduos, na tentativa de verificar se o medicamento poderá causar grandes efeitos colaterais, no caso de a metabolização não ser funcional. Estudos mostram que pacientes com mutações no gene CYP2C19, por exemplo, metabolizam de forma diferente o clopidogrel, um medicamento antiagregante plaquetário. Com base nessa informação genética, é possível ajustar a dose ou substituir o medicamento para otimizar os resultados terapêuticos.

Outro avanço significativo é a terapia gênica, que visa a corrigir, ou a substituir, genes defeituosos para tratar doenças genéticas. Isso se realiza através da técnica CRISPR-Cas9, a qual se baseia em um sistema de defesa natural encontrado em bactérias, onde uma proteína Cas e uma sequência de RNA guiam o corte em uma sequência específica de DNA. Esse RNA guia é desenhado para reconhecer

a sequência-alvo no genoma humano. A Cas9 corta o DNA naquela posição específica e o corte pode ser reparado pelo próprio sistema de reparo celular, o que permite a inserção, a deleção ou a correção de genes defeituosos.

Na oncologia, por exemplo, a terapia gênica tem sido usada para modificar células do sistema imunológico, como os linfócitos T, para combater tumores. Essa abordagem, conhecida como CAR-T (receptor quimérico de antígeno de células T), é usada no tratamento de leucemias e de linfomas, modificando, geneticamente, as células do paciente para que reconheçam e ataquem células cancerosas de forma específica.

Um dos grandes desafios desses tratamentos é o acesso, devido ao custo elevado. Apesar disso, esforços governamentais e de associações de pacientes têm sido realizados para a democratização desses acessos, tanto para a realização de testes genéticos, quanto para tratamentos. Alguns testes são disponíveis no SUS, como o teste do pezinho, o cariótipo, o FISH e o painel para fibrose cística, por exemplo. Na saúde suplementar, outros testes possuem cobertura mediante a justificativa com critérios presentes nos documentos da Agência Nacional de Saúde.

Conhecer os conceitos da genética e da genômica engrandece atuações na prática clínica, uma vez que podem auxiliar em processos diagnósticos, na escolha de tratamentos para melhores prognósticos e nas orientações mais personalizadas para a prevenção, no caso de pacientes em risco de desenvolverem doenças que, ainda, não se manifestaram.

Caso 1

Carlos, 28 anos, apresentou um episódio de síncope durante uma corrida leve. Foi levado ao pronto-socorro, onde o exame físico inicial revelou um sopro cardíaco sistólico leve. Após avaliação adicional com ecocardiograma, foi diagnosticado com miocardiopatia hipertrófica (MCH), caracterizada por um espessamento anormal do músculo cardíaco, especialmente do septo interventricular.

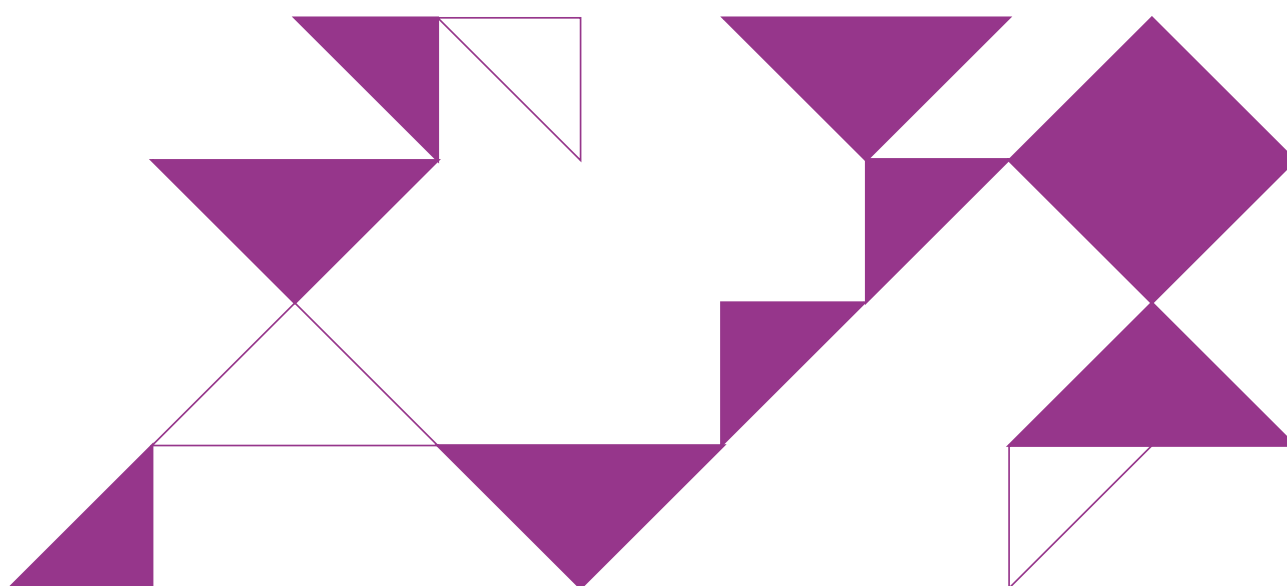
História Familiar: Carlos tem um histórico familiar significativo para doenças cardíacas. Seu pai faleceu, subitamente, aos 45 anos devido a uma parada cardíaca, sem diagnóstico prévio de cardiopatia. A mãe de Carlos e sua avó materna não têm histórico de doenças cardíacas, mas seu tio paterno foi diagnosticado com miocardiopatia hipertrófica aos 50 anos e está em acompanhamento com medicamentos. Diante desse contexto, Carlos foi encaminhado para a avaliação genética.

Análise e Justificativa para o Teste

Genético: A miocardiopatia hipertrófica é uma condição com forte componente hereditário, frequentemente, causada por mutações em genes específicos que afetam proteínas do sarcômero, como os genes MYH7 (cadeia pesada da miosina) e MYBPC3 (proteína de ligação da miosina C). Estima-se que até 60% dos casos de MCH tenham uma causa genética identificável.

Dada a idade jovem de Carlos, ao apresentar sintomas e o histórico familiar de morte súbita e miocardiopatia, a realização de um teste genético é fundamental para confirmar o diagnóstico de uma causa hereditária.

Escolha do Teste Genético: Recomenda-se um painel de genes para miocardiopatia. Esse painel deve incluir genes, comumente, associados à miocardiopatia hipertrófica, como MYH7, MYBPC3, TNNI3 e TNNT2, bem como genes envolvidos em outras miocardiopatias familiares, para garantir uma análise abrangente.



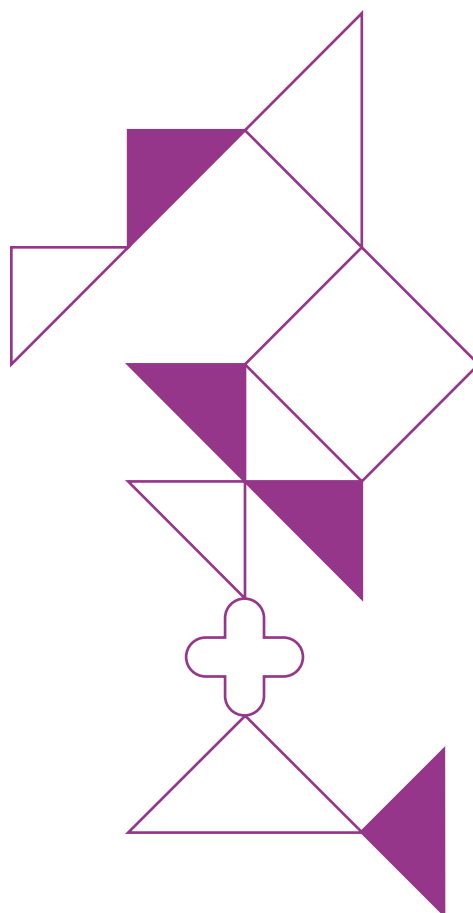
Justificativa do Painel de Genes

1. **Identificação de Risco para Familiares:** Se uma mutação causadora da miocardiopatia hipertrófica for encontrada, parentes de primeiro grau de Carlos, como irmãos e filhos, poderão realizar o teste genético para verificar se herdaram a mesma mutação, permitindo a identificação precoce de risco e o início de medidas preventivas, como acompanhamento clínico regular e restrição de atividades intensas.
2. **Prevenção de Eventos Fatais:** O histórico familiar de morte súbita indica que Carlos e outros membros da família podem estar em risco elevado. A presença de uma mutação patogênica confirmaria a necessidade de monitoramento rigoroso e, possivelmente, a consideração de um desfibrilador cardíaco implantável (CDI) para prevenir a morte súbita.
3. **Condução Terapêutica:** A presença de mutações em determinados genes pode influenciar o prognóstico e o manejo da MCH. O conhecimento da causa genética permite o acompanhamento direcionado e o uso de terapias adequadas, como medicamentos para reduzir a carga de trabalho do coração ou intervenções cirúrgicas, como a miectomia septal, quando necessário.

Resultado Esperado e Orientação Pós-Teste:

Teste: Se o teste identificar uma mutação patogênica, Carlos será orientado a adotar medidas preventivas, incluindo restrições de atividades físicas intensas e monitoramento cardiovascular regular. O teste, também, será oferecido a familiares próximos, permitindo a triagem precoce e a prevenção em parentes assintomáticos.

Esse caso ilustra a importância do teste genético em cardiopatias hereditárias para direcionar o acompanhamento e para oferecer prevenção tanto ao paciente quanto aos familiares, que também podem estar em risco de complicações graves.



Caso 2

Maria, 32 anos, foi diagnosticada com câncer de mama aos 30 anos, após o achado de um nódulo palpável em sua mama direita. A biópsia revelou um carcinoma ductal invasivo, receptor hormonal positivo (ER+ e PR+), HER2-negativo. Diante da idade jovem e do histórico familiar, Maria foi encaminhada para aconselhamento genético e avaliação de testes genéticos para câncer hereditário.

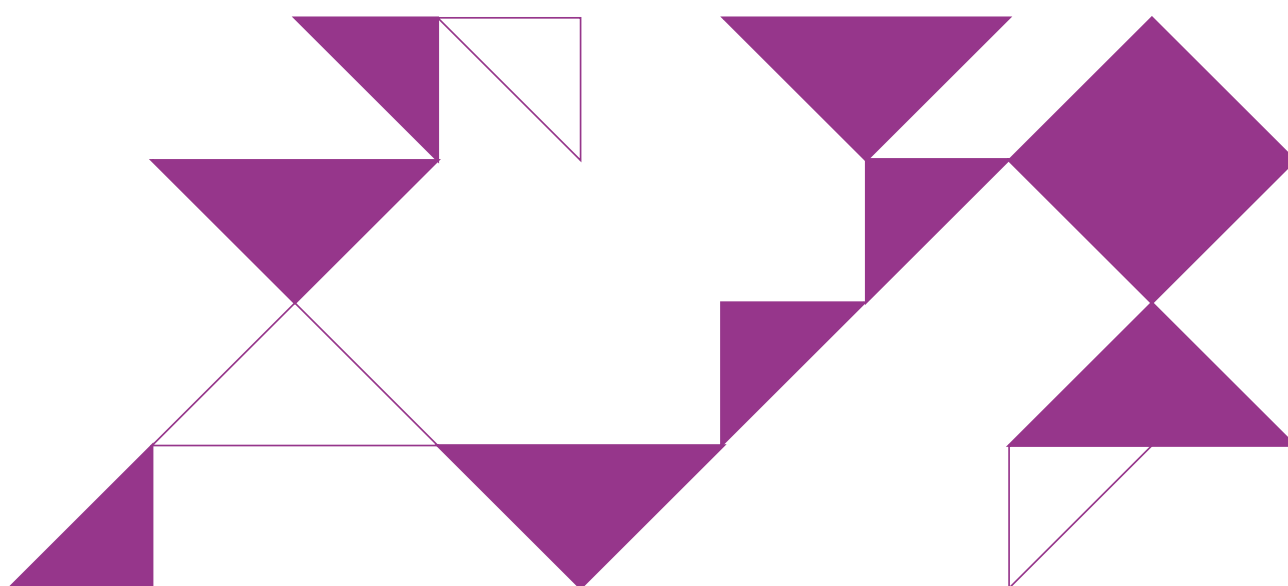
História Familiar: Maria possui um histórico familiar significativo para câncer de mama e ovário. Sua mãe foi diagnosticada com câncer de mama aos 40 anos e faleceu aos 52. A avó materna teve câncer de ovário aos 60 anos e uma tia materna foi diagnosticada com câncer de mama aos 42 anos. Não há histórico de câncer entre os parentes paternos.

Análise e Justificativa para o Teste

Genético: O diagnóstico de câncer de mama em idade jovem e a história familiar de

câncer de mama e ovário são características sugestivas de uma predisposição genética, especialmente para síndromes hereditárias associadas aos genes BRCA1 e BRCA2. Mutação nesses genes aumenta, substancialmente, o risco de câncer de mama e de ovário, além de outros cânceres, como o de pâncreas e de próstata.

Escolha do Teste Genético: Dado o perfil de Maria, recomenda-se um painel de genes para câncer hereditário, com enfoque em genes associados ao câncer de mama e de ovário, incluindo BRCA1 e BRCA2, bem como outros genes de predisposição ao câncer de mama, como TP53 (síndrome de Li-Fraumeni), PALB2, CHEK2 e ATM. Ou, se houver possibilidade, realizar painéis mais expandidos, com todos os genes já conhecidos para a Síndrome de Predisposição Hereditária ao câncer. Essa abordagem abrangente é apropriada, pois possibilita uma análise completa e pode identificar outras variantes que poderiam impactar o risco de câncer.



Justificativa do Painel de Genes

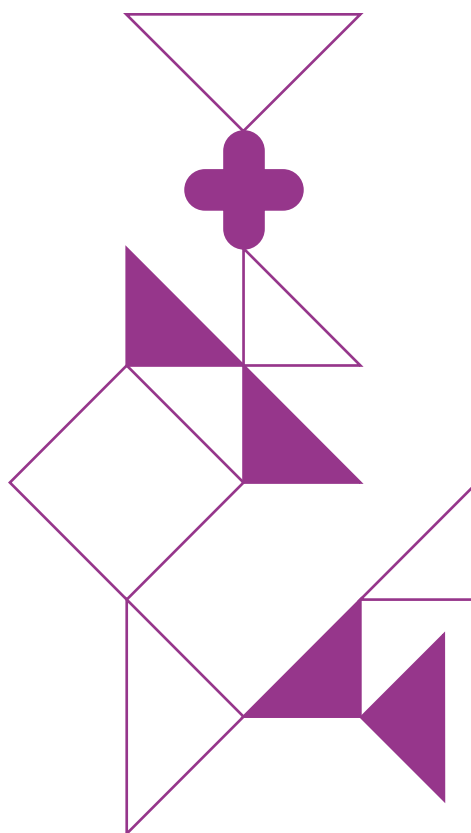
1. Risco Elevado em Idade Jovem: Maria apresenta câncer de mama em idade jovem, uma característica importante na suspeita de síndromes hereditárias. Estudos mostram que mutações no BRCA1 e BRCA2 são mais comuns em pacientes com diagnóstico precoce.
2. História Familiar Padrão Hereditário: A presença de múltiplos casos de câncer de mama e de ovário em parentes de primeiro e segundo grau no lado materno da família fortalece a indicação do teste, uma vez que as mutações BRCA são transmitidas de maneira autossômica dominante.
3. Impacto na Conduta Clínica: A identificação de uma mutação em BRCA1 ou BRCA2 pode impactar, diretamente, o manejo clínico de Maria. Ela poderia ser candidata a uma mastectomia bilateral redutora ou à ooforectomia profilática, reduzindo o risco de novos cânceres.
4. Orientação Familiar: A descoberta de uma mutação permitiria um rastreamento genético e clínico adequado para outros membros da família. Parentes próximos poderiam beneficiar-se de exames de rastreamento precoce e de medidas preventivas.

Resultado Esperado e Orientação Pós-

Teste: Se o teste identificar uma mutação patogênica em BRCA1 ou BRCA2, Maria será orientada quanto às opções de vigilância intensiva e às intervenções redutoras de risco. Familiares próximos, também, seriam encaminhados para testes genéticos, ampliando as possibilidades de prevenção familiar.

Esse caso ilustra a importância do teste genético para identificar e para manejar cânceres hereditários, especialmente, quando fatores, como idade e histórico familiar forte, estão presentes.

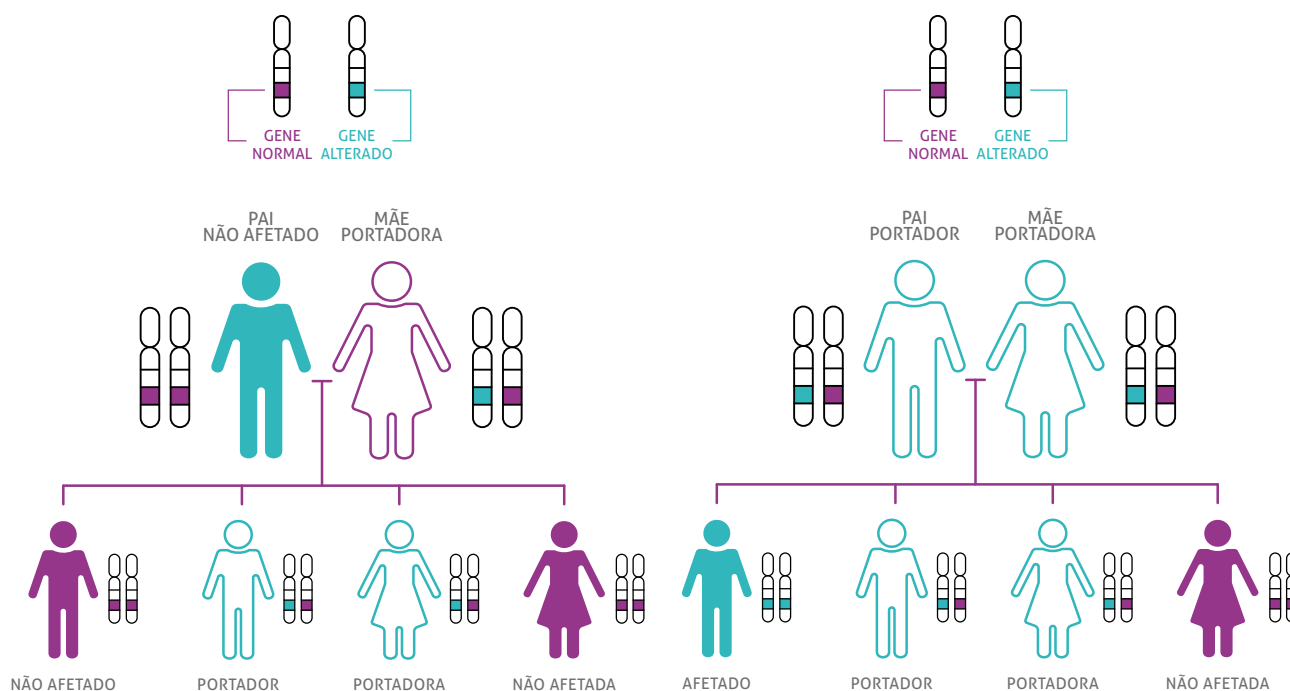
Nos próximos módulos iremos aprender conceitos mais específicos da genética e da genômica no contexto da oncologia e da cardiologia, expandindo mais os conhecimentos para aprimorar a prática clínica, auxiliando pacientes e seus familiares com condutas mais personalizadas.



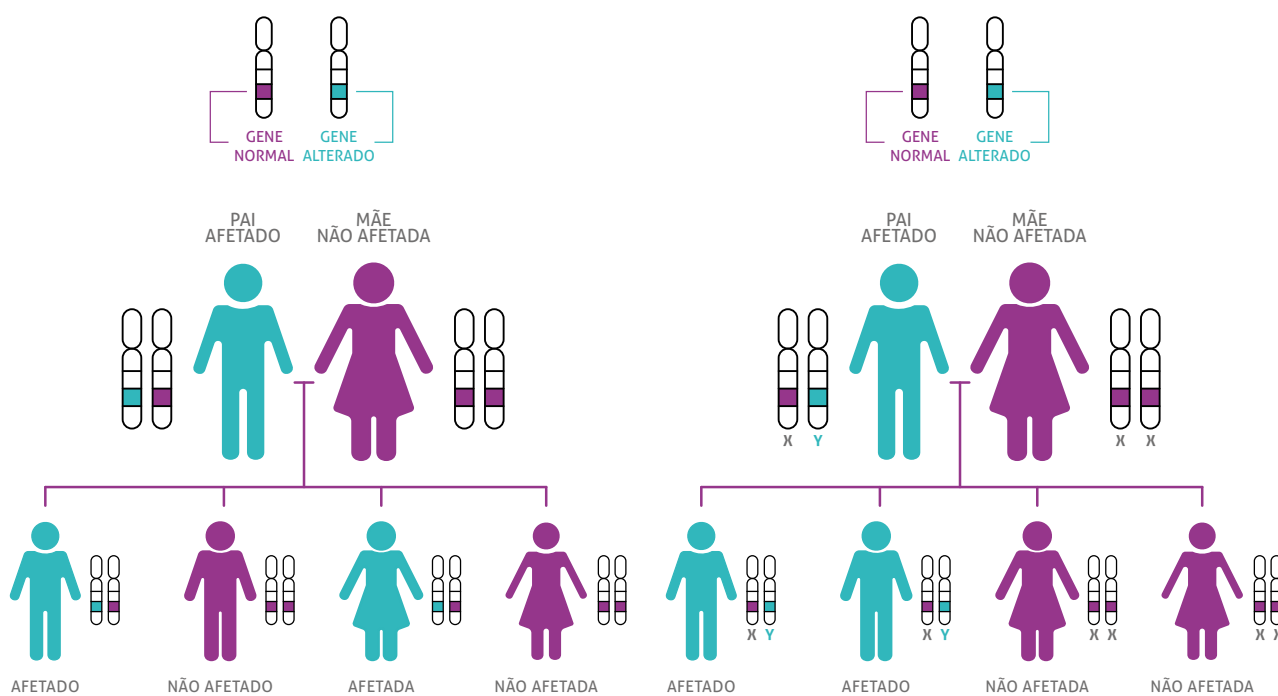
Material Complementar 1

Tipos de Padrão de Herança

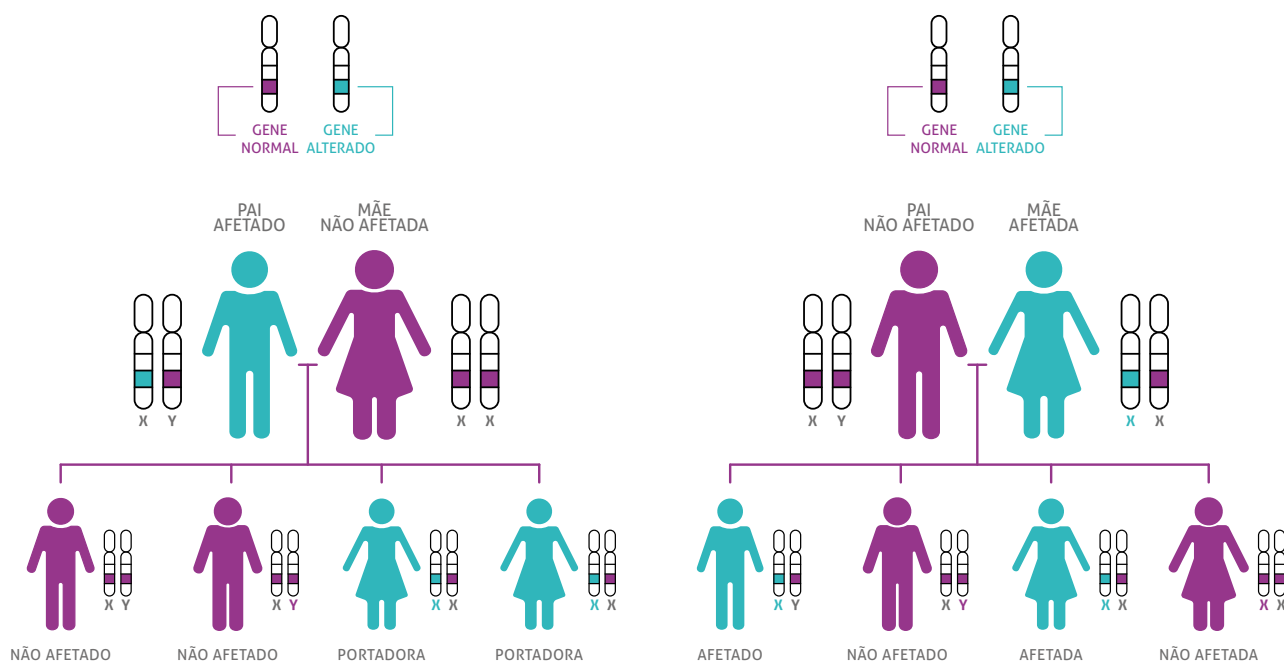
Padrão de herança autossômica recessiva



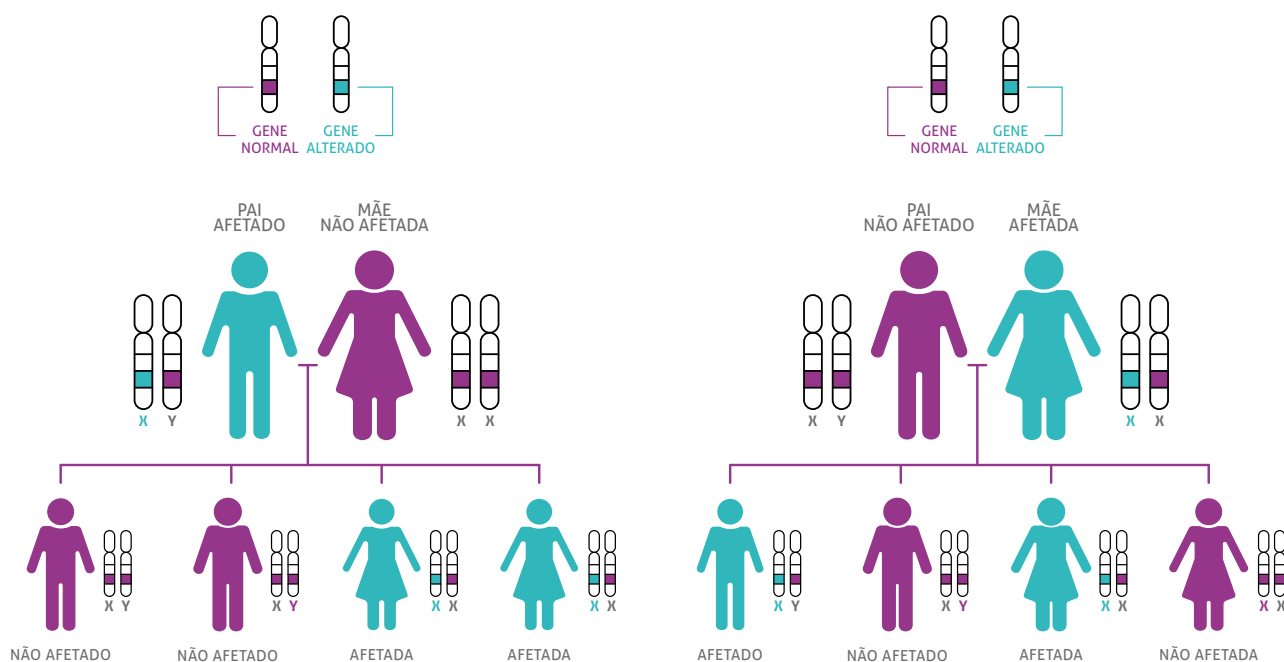
Padrão de herança autossômico dominante Padrão de herança ligada ao cromossomo Y



Padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X



Padrão de herança dominante ligado ao cromossomo X



Material Complementar 2

Tabela explicativa entre técnicas de análise cromossômicas com suas vantagens e desvantagens

Técnica	Descrição	Aplicações	Vantagens	Desvantagens
Cariótipo	Técnica que analisa o número e a estrutura dos cromossomos em células. Usualmente feita a partir de células em divisão (metáfase)	Diagnóstico de aneuploidias, síndromes cromossômicas e desordens genéticas.	Fornecer uma visão geral dos cromossomos; identifica rearranjos cromossômicos grandes.	Resolução limitada (não detecta pequenas alterações)
MLPA	Técnica de amplificação múltipla de pares de bases, que permite detectar variações no número de cópias de segmentos de DNA.	Diagnóstico de deleções e duplicações em genes específicos, como na Distrofia Muscular de Duchene.	Alta sensibilidade e especificidade para detectar alterações genéticas; pode ser realizado em amostras pequenas.	Não fornece informações sobre rearranjos estruturais complexos.
FISH	Hibridização in situ fluorescente, que utiliza sondas fluorescentes para detectar e localizar sequências específicas de DNA nos cromossomos.	Diagnóstico de aneuploidias, translocações e deleções em células.	Alta resolução; permite visualização de alterações cromossômicas em células individuais.	Requer sondas específicas e não detecta alterações em todo o genoma.
CGH Array	Hibridização genômica comparativa em microarranjos, que permite a análise do número de cópias de milhares de genes simultaneamente.	Identificação de deleções e duplicações em todo o genoma; usada em câncer e doenças genéticas.	Alta resolução e abrangência; detecta pequenas alterações genéticas em todo o genoma.	Pode identificar variações de significado incerto; não detecta alterações de estrutura ou ponto a ponto.

Referências para consultar e aprofundar!

AMENDOLA, L. M.; MUENZEN, K.; BIESECKER, L. G.; et al. Variant Classification Concordance using the ACMG-AMP Variant Interpretation Guidelines across Nine Genomic Implementation Research Studies. *American Journal of Human Genetics*, v. 107, n. 5, p. 932-941, 2020. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.09.011.

AMENDOLA, L. M.; GOLDEN-GRANT, K.; SCOLLON, S. Scaling Genetic Counseling in the Genomics Era. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 22, p. 339-355, 2021. DOI: 10.1146/annurev-genom-110320-121752

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Genetic Testing. Disponível em: <https://www.ama-assn.org/delivering-care/precision-medicine/genetic-testing>. Acesso em: 28 dez. 2022.

BAZAN, S. G. Z.; OLIVEIRA, G. O. D.; SILVEIRA, C. F. D. S. M. P. D.; et al. Hypertrophic cardiomyopathy: a review. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, p. 927-935, 2020.

BIORENDER. Ontário: BioRENDER, c2017. Disponível em: <https://www.biorender.com/learn>. Acesso em: 2 fev. 2025.

BURKE, W. Genetic testing. *N Engl J Med*, v. 347, n. 23, p. 1867-1875, 2002.

COSTA, C. C. P.; et al. Aplicação da hibridização genômica comparativa no diagnóstico e prognóstico das doenças oncológicas. *Revista Cereus*, v. 12, n. 2, p. 147-162, 2020.

DEN DUNNEN, J. T.; DALGLEISH, R.; MAGLOTT, D. R.; et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*, v. 37, n. 6, p. 564-569, 2016. DOI: 10.1002/humu.22981

DOS SANTOS, T. R.; BENTO, I. A.; DE OLIVEIRA MOURA, K. K. V.; DA COSTA RIZZO, I. R. Influência do polimorfismo CYP2C19 na terapia do Clopidogrel. *Rev. eletrônica farm*, v. 13, n. 1.1, 2016.

FACIO, F. M.; LEE, K.; O'DANIEL, J. M. A genetic counselor's guide to using next-generation sequencing in clinical practice. *J Genet Couns.*, v. 23, p. 455-462, 2014.

FREITAS, A.; PINTO, H. Sequenciamento NGS: Status e Perspectivas. 2021. DOI: 10.51780/978-6-599-275326-04.

GARRIDO-CARDENAS, J. et al. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors*, Basel, v. 17, p. 588-603, 2017.

GERSEN, S.; KEAGLE, M. The principles of clinical cytogenetics. New York: Springer, 2013.

HARRISON, S. M.; BIESECKER, L. G.; REHM, H. L. Overview of Specifications to the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines. *Curr Protoc Hum Genet.*, v. 103, n. 1, e93, 2019. DOI: 10.1002/cphg.93.

HOLTZMAN, N. A.; WATSON, M. S. Promoting safe and effective genetic testing in the United States. Final report of the Task Force on Genetic Testing. *J Child Fam Nurs*, v. 2, p. 388-390, 1999.

HURET, J.L. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Poitiers, 2008. Disponível em: <https://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30067/nomenclature-for-the-description-of-mutations-and-other-sequence-variations>. Acesso em: 2 fev. 2025.

IIHG - Iowa Institute of Human Genetics. Iowa City: Carver College of Medicine. Disponível em: https://medicine.uiowa.edu/humangenetics/sites/medicine.uiowa.edu/humangenetics/files/wysiwyg_uploads/IIHG_Testing_Proof3%20FINAL%202018.pdf Acesso em: 2 fev. 2025.

ISCN - An international system for human cytogenetic nomenclature. McGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. (Eds.). Basel: Karger, 2016.

KORF, B. R.; PYERITZ, R. E.; GRODY, W. W. Nature and frequency of genetic disease. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics. Academic Press, p. 47-51, 2019.

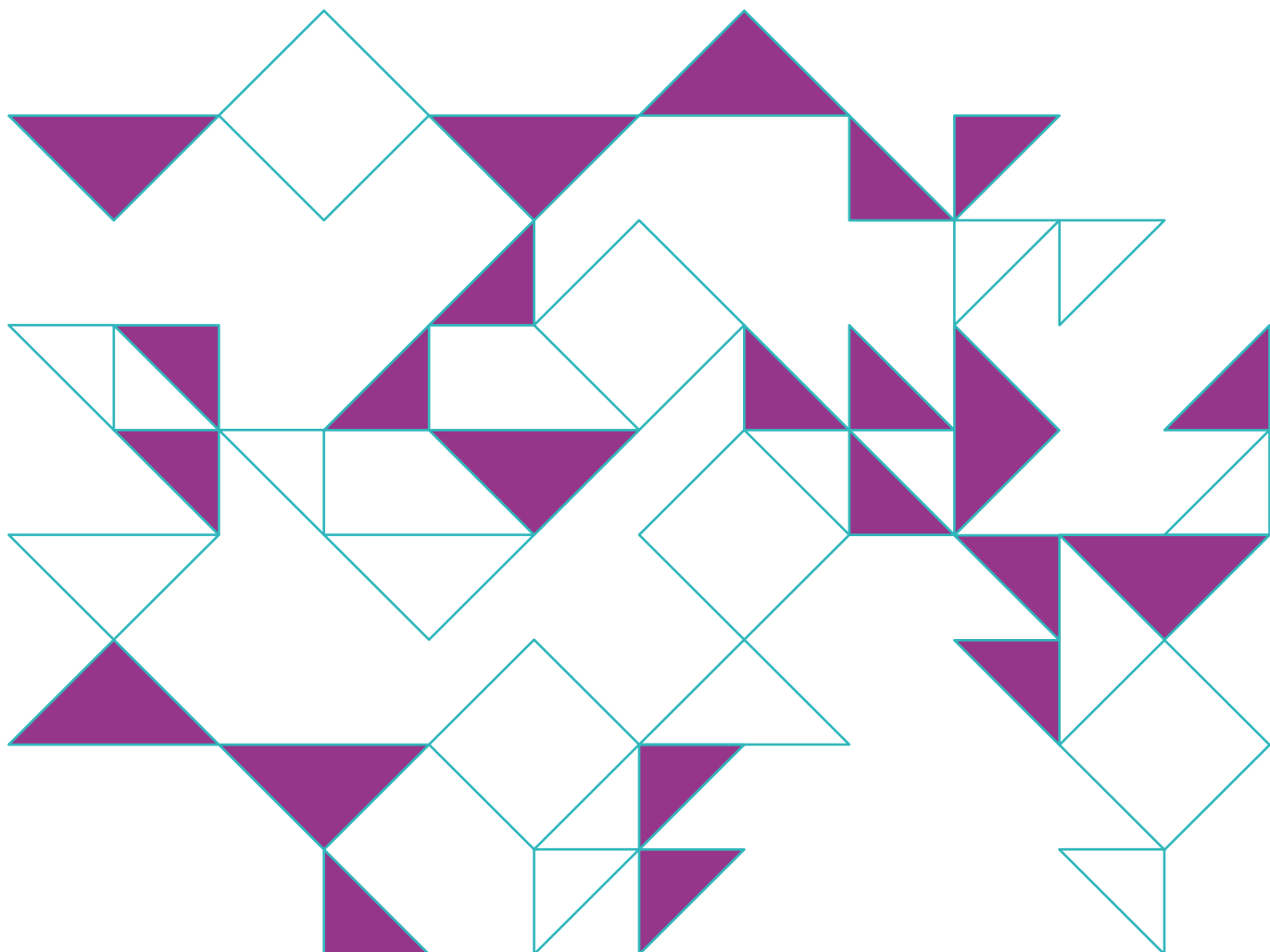
LAWCE, H. J.; BROWN, M. G. Cytogenetics: an overview. In: ARSHAM, M. S. (ed.). The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, p. 25-85, 2017.

LEE, C. R. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2022 Update. *Clin Pharmacol Ther.*, v. 112, n. 5, p. 959-967, 2022. DOI: 10.1002/cpt.2526.

LIU, W. et al. Applications and challenges of CRISPR-Cas gene-editing to disease treatment in clinics. *Precis Clin Med.*, v. 4, n. 3, p. 179-191, 2021. DOI: 10.1093/pcmedi/pbab014.

LOPES, R. E. Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos miRNAs 100 e 146a como fatores prognósticos do câncer de próstata. 2021. Tese (Doutorado em Urologia) – Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo, 2021. DOI: 10.11606/T.5.2021.tde-23072021-104545.

- MARIAN, A. J. Molecular Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res.*, v. 128, n. 10, p. 1533-1553, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318346.
- MARTIN, C. L.; WARBURTON, D. Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: from karyotype to genome sequence. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 16, p. 309-326, 2015.
- MCPHERSON, E. Genetic diagnosis and testing in clinical practice. *Clin Med Res.*, v. 4, n. 2, p. 123-129, 2006. DOI: 10.3121/cmr.4.2.123.
- METCALFE, S. A. Genetic counselling, patient education, and informed decision-making in the genomic era. *Semin Fetal Neonatal Med.*, v. 23, n. 2, p. 142-149, 2018. DOI: 10.1016/j.siny.2017.11.010.
- MUZZEY, D.; EVANS, E. A.; LIEBER, C. Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. *Current genetic medicine reports*, v. 3, n. 4, p. 158-165, 2015.
- NUSSBAUM, R. Thompson & Thompson genética médica. Elsevier Brasil, 2008.
- NUSSINOV, R.; TSAI, C. J.; JANG, H. Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug Resist Updat.*, v. 59, p. 100796, 2021. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100796.
- PARK, S. T.; KIM, J. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *Int Neurol J*, v. 20, Suppl. 2, p. S76, 2016.
- RABBANI, B.; TEKIN, M.; MAHDIEH, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*, v. 59, n. 1, p. 5-15, 2014.
- RATAN, Z. A. et al. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science. *Cureus*, v. 9, n. 6, 2017.
- RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. *Genet Med*, v. 17, p. 405-423, 2015. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- ROONEY, D. E. (ed). Human cytogenetics: constitutional analysis: a practical approach. Oxford University Press, USA, 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 12, 1977.
- SANTOS, W. F. et al. Sequenciamento de DNA: métodos e aplicações. *Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress*, v. 13, 2013.
- SHINAWI, M.; CHEUNG, S. W. The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*, v. 13, n. 17-18, p. 760-770, 2008.
- STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*, v. 13, p. 3245-76, 2012.
- VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science & Business Media, 2008.
- VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science*, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.
- VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, v. 55, n. 4, p. 641-658, 2009.
- YUNIS, J. J.; SANCHEZ, O. G-banding and chromosome structure. *Chromosoma*, v. 44, n. 1, p. 15-23, 1973.
- ZARREI M.; MacDonald J. R.; MERICO D.; SCHERER S. W. (2015) A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* 16:172-183
- Shutterstock¹ <<https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/genes-vector-illustrationeducational-labeled-structure-1705253155>>. Acesso em 17 mar. 2025.
- Shutterstock² <<https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/cell-division-mitosis-vector-scheme-645181432>>. Acesso em 28 nov. 2022.



Rua Maestro Cardim, 769
01323-900 Bela Vista São Paulo
Tel. 11 3505 1000

/bporgbr
bp.org.br